

# **Efeito de nanopartículas de prata em neutrófilos humanos**

**U. PORTO**



**FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO**

**Tânia Sofia Couto Soares**

Trabalho realizado sob a orientação da  
Doutora Marisa Andreia Carvalho de Freitas e co-orientação da  
Professora Doutora Eduarda das Graças Rodrigues Fernandes

setembro 2014

Autoria: Tânia Sofia Couto Soares

Curso: Mestrado em Controlo de Qualidade

Título da Tese: Efeito de nanopartículas de prata em neutrófilos humanos

Orientação: Doutora Marisa Freitas

Co-orientação: Professora Doutora Eduarda Fernandes

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Departamento de Ciências Químicas

Laboratório de Química Aplicada

*Dissertação do 2º ciclo de  
Estudos Conducente ao Grau de  
Mestre em Controlo de Qualidade.*

# Declaração de Reprodução

É autorizada a reprodução integral desta dissertação apenas para efeitos de investigação mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

# Declaração de Integridade

Eu, Tânia Sofia Couto Soares, abaixo assinado, nº 200901630, estudante do Mestrado em Controlo de Qualidade da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração desta dissertação.

Nesse sentido, confirmo que NÃO incorri em plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores foram referenciadas ou redigidas com novas palavras, tendo neste caso colocado a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de \_\_\_\_

Assinatura:

---

# Agradecimentos

Este mestrado lembrou-me de como é maravilhoso fazer algo com real gosto, e no final desta etapa, gostaria de deixar o meu sincero agradecimento às pessoas que contribuíram para a sua concretização.

À Doutora Marisa Freitas, minha orientadora, por ter sido a luz que me guiou e orientou neste projeto. O seu trabalho foi extraordinário pela ajuda, incentivo, rigor, paciência e amizade. Faltam-me as palavras para descrever o modo como contribuiu para que esta dissertação fosse uma realidade.

À Professora Doutora Eduarda Fernandes, minha co-orientadora, por me ter recebido com simpatia no seu laboratório e proporcionado as condições para a elaboração deste projeto. O seu interesse e exigência, associada ao conhecimento que transmite, dá o exemplo de uma liderança de excelência com a qual consegue cativar a admiração e respeito.

Ao Professor Doutor Félix Carvalho, diretor do Mestrado de Controlo de Qualidade que sempre se mostrou disponível para esclarecer as nossas dúvidas e proporcionar o diálogo para que os nossos projetos fossem de encontro aos nossos gostos.

À Daniela e Diana, que foram ajudas preciosas no laboratório com os seus conselhos e elucidações. Ensinarão-me a respeitar os desígnios da natureza do laboratório: “Se correr mal, melhores dias virão”. Assim, como agradeço a todo o grupo em geral pelas dicas e principalmente ao bom ambiente que proporcionaram.

Ao David, que acredita mais em mim do que eu própria. Agradeço por estar sempre do meu lado com o amor, a paciência e a compreensão a que me habituou.

À Irene por ser a tia, amiga e irmã que sempre me apoiou em todas as decisões da minha vida.

À Sara à Eliana e à Laura por me honrarem com uma amizade tão verdadeira e tão essencial nesta fase.

Aos meus pais e avós que muito contribuíram para o meu percurso. Agradeço o amor, o apoio e a confiança que sempre depositaram em mim.

À Carolina e à Sofia por me encherem a vida de gargalhadas, brincadeiras, traquinices e muitos beijinhos.

Por último, a todos os dadores da unidade de hematologia do Hospital de Santo António que contribuíram com a sua dádiva de sangue para que fosse possível a elaboração deste trabalho.

# Resumo

As nanopartículas de prata (AgNPs) têm emergido como uma importante classe de nanomateriais com uma ampla gama de aplicações industriais e médicas. Têm aplicações, ou possíveis aplicações, como agentes antibacterianos, antifúngicos, antivirais, anti-inflamatórios, antitumorais, regeneradores, biossensores e catalisadores. Apesar da frequente utilização das AgNPs no nosso quotidiano, os seus efeitos tóxicos não se encontram ainda totalmente esclarecidos e pouco se sabe da sua interação com os neutrófilos humanos. Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes do organismo e representam a primeira linha de defesa do nosso organismo contra uma grande diversidade de ameaças. A atividade excessiva destas células pode causar danos nos tecidos e células adjacentes.

Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade de dois tamanhos diferentes de AgNPs (10 e 50 nm) em neutrófilos humanos.

Para o efeito recorreu-se a três métodos diferentes, o método de exclusão do azul tripano, o do iodeto de propídio (PI) e o do vermelho neutro (NR). Verificou-se que a viabilidade dos neutrófilos foi alterada com a exposição às AgNPs, tendo as AgNPs de 10 nm um efeito muito mais deletério. Estes dados foram observados com todos os métodos. Contudo, o método que permitiu ver diferenças significativas relativamente ao controlo (sem AgNPs) com tempos de exposição mais curtos foi o NR. Com este método verificou-se que com apenas 4h de exposição, 25 µg/mL de AgNPs (10 nm) foram suficientes para diminuir a viabilidade cerca de 22%.

No segundo trabalho experimental, analisou-se a morfologia das células após exposição às AgNPs, por duas técnicas de microscopia, a microscopia ótica composta (MOC) e a microscopia eletrónica de transmissão (TEM). Verificaram-se alterações morfológicas com ambas as técnicas, estando mais uma vez implícito o maior efeito das AgNPs de 10 nm, não se verificando inclusivamente o efeito com as AgNPs de 50 nm recorrendo a TEM. De notar que com TEM foi possível confirmar que as AgNPs de 10 nm têm a capacidade de entrar na célula, podendo assim, justificar a sua maior toxicidade quando comparadas com as AgNPs de 50 nm. Está descrita na literatura a capacidade destas nanopartículas induzirem a produção de espécies reativas, sendo esta uma das vias pela qual as AgNPs induzem toxicidade. Como tal, o objetivo do terceiro e último trabalho experimental consistiu na avaliação do efeito das AgNPs na

produção de espécies reativas pelos neutrófilos humanos. Concluiu-se que as AgNPs de 10 nm induziram a produção de espécies reativas ao fim de 4h desta exposição.

Este trabalho permitiu concluir, que nas condições experimentais testadas, as AgNPs induzem citotoxicidade em neutrófilos humanos, sendo que, as de menor diâmetro (10 nm) revelaram ser mais citotóxicas.

Palavras-chave: nanopartículas de prata; neutrófilos humanos; citotoxicidade, espécies reativas

# Abstract

Silver nanoparticles (AgNPs) have emerged as an important class of nanomaterials with a wide range of industrial and medical applications. They have applications, or potential applications, as antibacterial, antifungal, antiviral and anti-inflammatory agents, antitumor, regenerators, catalysts and biosensors. Despite the routinely use of AgNPs in our daily lives, its toxic effects are not yet fully understood and little is known of their interaction with human neutrophils. Neutrophils are the most abundant leukocyte in the body and represent the first line of defense of our organism against a wide variety of threats. Excessive activity of these cells can cause tissue damage and adjacent cells.

Therefore, the objective of this study was to evaluate the toxicity of two different sizes of AgNPs (10 and 50 nm) in human neutrophils.

For the effect three different methods were used, the method of exclusion of trypan blue, propidium iodide (PI) and neutral red (NR). It was found that the viability of the neutrophils was altered by exposure to AgNPs, and the 10 nm AgNPs has a much more deleterious effect. These data were observed with all methods. However, the method that allowed the detection of significant differences, compared to control (without AgNPs), with shorter exposure times was NR. This method showed that with only 4 hours of exposure, 25 µg/mL AgNPs (10 nm) were enough to reduce the viability of about 22%.

In the second study, it was analyzed the morphology of the cells after exposure to AgNPs of two different sizes, by two microscopy techniques, light microscopy and transmission electron microscopy (TEM). Morphological changes with both techniques were observed, with the greatest effect observed with the 10 nm AgNPs. Using TEM it was possible to confirm that the 10 nm AgNPs has the ability to enter into the cell, which may explain its greater toxicity when compared with 50 nm AgNPs. It was already described in literature the ability of these nanoparticles to induce the production of reactive species, being this effect reported as one possible mechanism of toxicity induced by AgNPs. As such, in the third study it was evaluated the effect of AgNPs in the production of reactive species by human neutrophils. It was concluded that the 10 nm AgNPs induced the production of reactive species after 4 hours exposure.



This study revealed that, in the present experimental conditions, AgNPs are cytotoxic to human neutrophils, being the nanoparticles of 10 nm most active than the 50 nm.

Keywords: silver nanoparticles; human neutrophils; cytotoxicity; reactive species

# Índice

1.	Introdução geral.....	1
1.1	Considerações gerais .....	1
1.2	Objetivos do trabalho e estrutura da dissertação .....	1
2.	Introdução .....	2
2.1	Sangue .....	2
2.1.1	Eritrócitos.....	2
2.1.2	Plaquetas.....	4
2.1.3	Leucócitos .....	4
2.2	Nanopartículas de prata.....	15
2.2.1	Síntese, revestimento e caracterização .....	17
2.2.2	Aplicações .....	20
2.2.3	Toxicidade .....	26
3.	Material e Métodos .....	35
3.1	Materiais .....	35
3.2	Equipamento.....	35
3.3	Caracterização das AgNPs .....	35
3.4	Isolamento de neutrófilos humanos pelo método de centrifugação de gradiente de densidade.....	36
3.4.1	Fundamento do método .....	36
3.4.2	Procedimento experimental .....	36
3.5	Método da exclusão do azul tripano.....	38
3.5.1	Fundamento do método .....	38
3.5.2	Procedimento experimental .....	38
3.6	Determinação da libertação da lactato desidrogenase.....	38
3.6.1	Fundamento do método .....	38
3.6.2	Procedimento experimental .....	39

3.7 Método do iodeto de propídio .....	39
3.7.1 Fundamento do método .....	39
3.7.2 Procedimento experimental .....	39
3.8 Método do NR.....	40
3.8.1 Fundamento do método .....	40
3.8.2 Procedimento experimental .....	40
3.9 Análise morfológica por MOC .....	41
3.9.1 Fundamento do método .....	41
3.9.2 Procedimento experimental .....	41
3.10 Análise morfológica por TEM .....	42
3.10.1 Fundamento do método .....	42
3.10.2 Procedimento experimental .....	42
3.11 Avaliação do <i>burst</i> oxidativo dos neutrófilos .....	43
3.11.1 Fundamento do método .....	43
3.11.2 Procedimento experimental .....	43
3.12 Análise estatística .....	44
4. Resultados .....	45
4.1 Avaliação da viabilidade celular de neutrófilos humanos expostos a AgNPs	45
4.1.1 Método de exclusão do azul tripiano.....	45
4.1.2 Determinação da libertação de LDH .....	46
4.1.3 Método do PI .....	46
4.1.4 Método do NR.....	48
4.2 Análise morfológica por MOC .....	50
4.3 Análise morfológica por TEM.....	50
4.4 Efeito das AgNPs no <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos humanos .....	52
4.5 Contribuição da NADPH oxidase na ativação de neutrófilos humanos pelas AgNPs.....	53
5. Discussão.....	54
6. Referências bibliográficas.....	62

# Índice de Figuras

<b>Figura 1: Constituintes dos elementos figurados do sangue.</b>	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
<b>Figura 2: Eritrócitos. Os corpos roxos são plaquetas .....</b>	<b>3</b>
<b>Figura 3: Granulócitos e Agranulócitos .....</b>	<b>5</b>
<b>Figura 4: Linfócito .....</b>	<b>5</b>
<b>Figura 5: Monócito.....</b>	<b>6</b>
<b>Figura 6: Eosinófilo .....</b>	<b>7</b>
<b>Figura 7: Basófilo .....</b>	<b>7</b>
<b>Figura 8: Imagem de neutrófilos humanos .....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 9: Alterações morfológicas em neutrófilos necróticos .....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 10: Diapedese.....</b>	<b>12</b>
<b>Figura 11: Esquema representativo da produção de ROS e RNS pelos neutrófilos durante a fagocitose.....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 12: Comparação de tamanho entre proteínas e pequenas moléculas, NPs de 10 nm e uma célula animal.....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 13: Pigmentação azul acinzentada característica da argíria .....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 14: Biofuncionalização de AgNPs.....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 15: Controlo (A) e efeito antibacteriano (B) (<i>E. coli</i>) das AgNPs .....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 16: Mecanismos da atividade antibacteriana de iões de prata .....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 17: Modelo esquemático da infeção de uma célula eucariótica por um vírus e o mecanismo de ação antiviral das NPs metálicas.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 18: Imagens representativas da evolução da cicatrização dos grupos de tratamento. A- Dia 0, B- Dia 3 com solução salina, C- Dia 3 com nitrato de prata, D- Dia 3 com AgNPs.....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 19: Coloração imunocitoquímica de miofibroblastos diferenciados de fibroblastos embrionários de ratinhos sob a influência de AgNPs .....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 20: Representação esquemática da indução da apoptose provocada pelas AgNPs.....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 21: Principais vias de entrada das AgNPs (vermelho) e partes do corpo cuja exposição a AgNPs deve ser evitada (a preto).....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 22: Passagem de NPs a partir da mucosa nasal para o cérebro através das terminações do nervo olfativo .....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 23: Esquema resumo do procedimento referente ao isolamento de neutrófilos humanos. ....</b>	<b>37</b>

Figura 24: Placa de 98 poços onde e notam as gradações de cor devidas ao corante NR. ....	41
Figura 25: A: Sistema constituído pela lâmina, funil e suporte. B: citocentrífuga....	42
Figura 26: Oxidação da DHR 123 a R 123.....	43
Figura 27: Avaliação da viabilidade celular de neutrófilos humanos pelo método de exclusão do azul tripano.....	48
Figura 28: Avaliação da viabilidade celular de neutrófilos humanos expostos a AgNPs de 10 e 50 nm (0-100 µg/mL) pelo método do PI após incubação de 4h (A). Imagens representativas da análise por citometria de fluxo dos neutrófilos PI positivos com 4h de incubação .....	47
Figura 29: Avaliação da viabilidade celular de neutrófilos humanos expostos a AgNPs de 10 e 50 nm (0-100 µg/mL) pelo método do PI após incubação de 6 h (A). Análise por citometria de fluxo dos neutrófilos PI positivos com 6 h de incubação.....	48
Figura 30: Avaliação da viabilidade celular de neutrófilos humanos expostos a AgNPs de 10 e 50 nm (0-100 µg/mL) pelo método do PI após incubação de 16 h (A). Análise por citometria de fluxo dos neutrófilos PI positivos com 16 h de incubação.....	48
Figura 31: Avaliação da viabilidade de neutrófilos humanos expostos a AgNPs de 10 e 50 nm (0-100 µg/mL) pelo método do NR .....	50
Figura 32: Morfologia de neutrófilos humanos quando expostos a AgNPs de 10 e 50 nm durante 6 e 16 h. ....	50
Figura 33: Imagens por TEM de neutrófilos humanos expostos a AgNPs de 10 e 50 nm (100 µg/mL) durante 16 h .....	51
Figura 34: Efeito das AgNPs de 10 e 50 nm (0-100 µg/mL) na produção de espécies reactivas pelos neutrófilos humanos.....	52
Figura 35: Efeito do DPI na ativação de neutrófilos humanos por AgNPs de 10 nm.....	53

# Índice de Tabelas

Tabela 1: Principais produtos no mercado contendo AgNPs (53). .....	16
Tabela 2: Estudos sobre o efeito das AgNPs <i>in vitro</i> .....	28
Tabela 3:Distribuição nos tecidos das AgNPs segundo as várias vias de exposição .....	32
Tabela 4: Percentagens dos elementos identificados por EDS.....	52

# Lista de Abreviaturas

- AFM**- Microscopia de força atômica (do inglês *Atomic Force Microscopy*)
- AgNPs**- Nanopartículas de prata
- ATP**- Trifosfato de adenosina (do inglês *Adenosine Triphosphate*)
- bFGF**- Fator de crescimento básico de fibroblastos (do inglês *Basic Fibroblast Growth Factor*)
- BSA**- Albumina sérica bovina (do inglês *Bovine Serum Albumin*)
- CO<sub>2</sub>**- Dióxido de carbono
- DHR**- Dihidrorodamina 123
- DLS**- Dispersão dinâmica de luz (do inglês *Dynamic Light Scattering*)
- DNA**- Ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic Acid*)
- DPI**- Cloreto de difenilenoiodóico (do inglês *Diphenylene Iodonium*)
- EDS**- Espectroscopia de raios X dispersiva de energia (do inglês *Energy Dispersive x-ray Spectrometer*)
- EDTA**- Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês *EthyleneDiamineTetraacetic Acid*)
- Fas L**- Ligando Faz
- GSH**- Glutathiona reduzida (do inglês *Glutathione*)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**-Peróxido de hidrogénio
- H** - Horas
- HOO•**- Radical hidroperóxido
- HBV**- Vírus da hepatite B (do inglês *hepatitis B virus*)
- HIV-1**- Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (do inglês *Human Immunodeficiency Virus type 1*)
- HO•**- Radical hidroxilo
- HOCl**- Ácido hipocloroso
- HSV**- Vírus *Herpes simplex* (do inglês *Herpes simplex Virus*)
- IFN- $\delta$** - Interferon  $\delta$
- IG**- Imunoglobulinas
- IL**- Interleucina
- JNK**- Cinase do terminal amínico de c-Jun (do inglês *c-Jun N-terminal Kinase*)
- LDH**- Lactato desidrogenase (do inglês *Lactate Dehydrogenase*)
- LGL**- Linfócitos granulares grandes
- LTC<sub>4</sub>**- Leucotrieno C<sub>4</sub>

**MES**- Sulfonato de sódio-2-mercaptoetano

**MIN.** - Minutos

**MOC**- Microscopia ótica composta

**MPO**- Mieloperoxidase

**NADPH**- Nicotinamida adenina dinucleótido difosfato (do inglês *Nicotinamide Adenine Dinucleotide PHosphate-oxidase*)

**NETs**- Armadilhas extracelulares de neutrófilos (do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*)

**•NO**- Óxido nítrico

**•NO<sub>2</sub>** - Dióxido de azoto

**N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>** - Óxido nitroso

**NOS**- Óxido nítrico sintetase (do inglês *Nitric Oxide Synthase*)

**NPs**- Nanopartículas

**NR**- Vermelho neutro (do inglês *Neutral Red*)

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** - Oxigénio singuleto

**O<sub>2</sub>•**- Anião radical superóxido

**ONOO<sup>-</sup>** - Anião peroxinitrito

**OsO<sub>4</sub>**- Ósmio

**PBS**- Tampão fosfato salino (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)

**PDGF**- Fator de crescimento derivado das plaquetas (do inglês *platelet-derived growth factor*)

**PEG**- Polietilenoglicol

**PEI**- Polietilenoimina

**PI**- Iodeto de propídio (do inglês *Propidium Iodide*)

**PS**- Fosfatidilserina (do inglês *PhosphatidylSerine*)

**PVP**- Polivinilpirrolidona

**R 123**- Rodamina 123

**RNA**- Ácido ribonucleico (do inglês *Ribonucleic Acid*)

**RNS**- Espécies reactivas de azoto (do inglês *Reactive Nitrogen Species*)

**ROO•**- Radicais peroxinitrilo

**ROS**- Espécies reactivas de oxigénio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)

**SEM**- Erro padrão da média (do inglês *Standard Error of the Mean*)

**SDS**- Dodecil sulfato de sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*)

**SOD**- Superóxido dismutase

**TEM**- Microscopia electrónica de transmissão (do inglês *Transmission Electron Microscopy*)



**TGF- $\beta$ 1**- Fator  $\beta$ 1 de transformação do crescimento (do inglês *Transforming Growth Factor  $\beta$ 1*)

**TGF- $\beta$** - Fator  $\beta$  de transformação do crescimento (do inglês *Transforming Growth Factor  $\beta$* )

**TNF- $\alpha$** - Fator de necrose tumoral (do inglês *Tumour Necrosis Factor*)

**TSLP**- Linfopoetina estromal tímica (do inglês *Thymic Stromal Lymphopoietin*)

**VEGF**- Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*)

# 1.Introdução geral

## 1.1 Considerações gerais

Esta dissertação foi realizada no âmbito do Curso de Mestrado em Controlo de Qualidade da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. O tema foi escolhido com base nas inúmeras aplicações e crescente utilização de nanopartículas no nosso quotidiano. As mais comumente utilizadas são as nanopartículas de prata (AgNPs), sendo que o seu impacto na saúde humana ainda não está totalmente estudado, havendo ainda muitas questões por esclarecer. Uma delas diz respeito ao efeito destas NPs em neutrófilos humanos, as principais células de defesa do organismo.

Assim sendo, a parte experimental desta dissertação envolve a avaliação da toxicidade de AgNPs de dois tamanhos diferentes (10 e 50 nm) em neutrófilos humanos.

## 1.2 Objetivos do trabalho e estrutura da dissertação

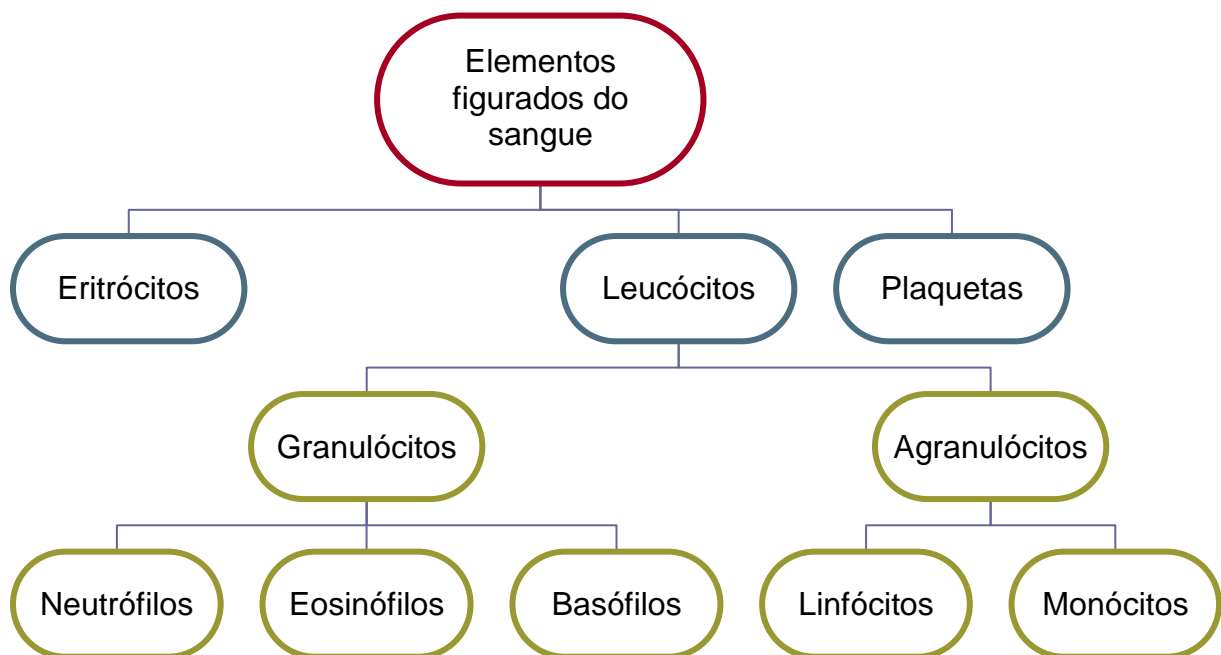
O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade de AgNPs, de dois tamanhos diferentes (10 e 50 nm), em neutrófilos humanos. Para atingir este objetivo dividiu-se o trabalho experimental em várias fases complementares. Na primeira fase avaliou-se, através de diferentes métodos, a viabilidade de neutrófilos humanos expostos às AgNPs. Na segunda fase analisou-se a morfologia das células por duas técnicas de microscopia. A última fase deste trabalho diz respeito à avaliação do efeito das AgNPs no *burst* oxidativo de neutrófilos humanos.

Esta dissertação encontra-se dividida em 5 capítulos e apresenta a seguinte estrutura: no **primeiro** capítulo apresenta-se uma caracterização de todos os componentes do sangue, focando nas células alvo deste estudo, os neutrófilos, bem como uma revisão da literatura onde se faz uma abordagem às principais características das AgNPs. No **segundo** capítulo são indicados materiais e métodos utilizados na fase experimental do trabalho. Este capítulo inclui o fundamento teórico das técnicas utilizadas e os procedimentos experimentais efetuados. Os Resultados obtidos são apresentados num **terceiro** capítulo, a que se segue a Discussão no **quarto** capítulo. Por último, são apresentadas as Referências Bibliográficas que sustentaram o desenvolvimento do presente trabalho.

## 2.Introdução

### 2.1 Sangue

O sangue é um tipo de tecido conjuntivo, constituído por células e fragmentos de células (elementos figurados) rodeados por uma matriz líquida (plasma), que circula pelo organismo. Os elementos figurados constituem cerca de 45% e o plasma 55% do volume total do sangue que, num adulto é em média cerca de 4 a 5 L nas mulheres e de 5 a 6 L nos homens. O sangue tem como principais funções o transporte, manutenção e proteção do organismo (1). Os elementos figurados dividem-se em eritrócitos, plaquetas e leucócitos, que serão discutidos nos pontos seguintes (**Figura 1**).



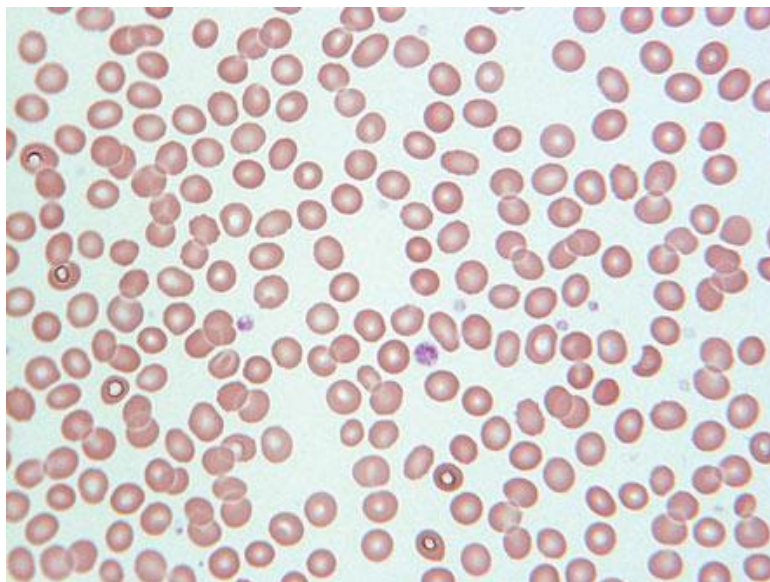
**Figura 1:** Constituintes dos elementos figurados do sangue

#### 2.1.1 Eritrócitos

Os eritrócitos, também conhecidos por glóbulos vermelhos ou hemácias, são as células maioritárias do sangue com cerca de 5 milhões por milímetro cúbico de sangue (700 vezes mais numerosas que os leucócitos e 17 vezes mais que as plaquetas) (1). Estas células têm a forma de discos bicôncavos (**Figura 2**) com um diâmetro

médio de cerca de 7  $\mu\text{m}$  e as extremidades mais espessas do que o centro da célula (1-3). Durante o processo de formação ocorrem processos de mitose, síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e hemoglobina, incorporação do ferro, perda de núcleo e organelos (3, 4). Sendo estas células anucleadas, têm maior capacidade de armazenamento, e também de deformabilidade, permitindo-lhes a passagem pelos capilares menores e assim, fornecer oxigénio a todos os tecidos (3).

Os eritrócitos desempenham funções de transporte de gases respiratórios, nomeadamente de oxigénio dos pulmões para os vários tecidos do corpo e de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) dos tecidos para o exterior. O transporte de oxigénio realiza-se através da ligação reversível à proteína hemoglobina que se encontra no interior destas células e é responsável pela cor vermelha do sangue (1, 2). Por outro lado, a presença de anidrase carbónica torna possível o transporte de grandes quantidades de  $\text{CO}_2$ . Esta enzima possui a importante função de catalisar a reação entre o  $\text{CO}_2$  e a água, dando origem a ácido carbónico, que por sua vez, se dissocia formando iões bicarbonato e hidrogénio. É sob a forma de bicarbonato que grande parte do  $\text{CO}_2$  é transportado para os pulmões onde é expelido. A produção de iões bicarbonato é também importante para a regulação do pH do sangue (1, 2). Estas células permanecem em circulação relativamente pouco tempo, cerca de 120 dias numa célula saudável (1, 2, 4).



**Figura 2:** Eritrócitos. Os corpos roxos são plaquetas (ampliação 400x) [adaptado de(3)].

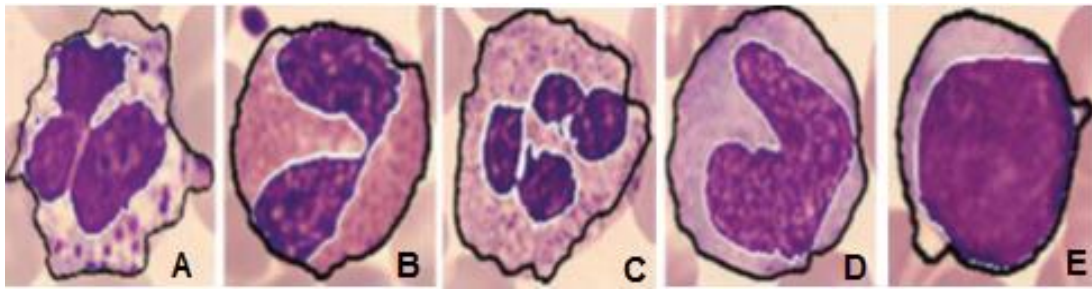
### 2.1.2 Plaquetas

As plaquetas, também designadas por trombócitos, são pequenos fragmentos de células (2 a 4  $\mu\text{m}$ ), com forma biconvexa, sem cor, sem núcleo, com um citoplasma composto por mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e vários grânulos que contêm citocinas e proteínas de coagulação. Têm um tempo de vida de 8 a 10 dias, após o qual, são eliminadas pelo baço (5).

A sua principal função é a formação de coágulos, participando portanto no processo de coagulação sanguínea. Em caso de lesão vascular, as plaquetas aderem às superfícies vasculares alteradas ou matrizes subendoteliais expostas em microssegundos. Após adesão, as plaquetas são ativadas, alteram a sua forma, libertam o conteúdo dos seus grânulos e agregam-se umas às outras formando o tampão hemostático primário. Este proporciona uma superfície catalítica que promove a coagulação do sangue (6). O número ou atividade excessiva das plaquetas pode causar oclusão dos vasos originando ataques cardíacos ou acidentes vasculares cerebrais (7).

### 2.1.3 Leucócitos

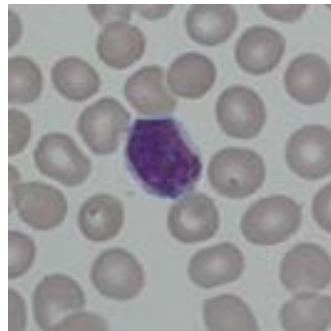
Os leucócitos ou glóbulos brancos são outro tipo de células do sangue. Os leucócitos podem ser agrupados consoante a sua morfologia em granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e agranulócitos (linfócitos e monócitos). O que os distingue é a presença ou ausência de grânulos no citoplasma. Os nomes dos diferentes tipos de células dos granulócitos resultam das propriedades de coloração dos seus grânulos. Os grânulos dos basófilos coram de azul-escuro com corantes básicos, os grânulos dos eosinófilos coram de rosa escuro com o corante ácido eosina e os grânulos dos neutrófilos como não coram com os corantes padrão de sangue são considerados “neutros” (**Figura 3**) (2, 4). Cada tipo de leucócitos será abordado de seguida, com uma descrição mais detalhada dos neutrófilos por serem as células alvo deste estudo.



**Figura 3:** Granulócitos: (A) - Basófilo, (B) - Eosinófilo, (C) – Neutrófilo; Agranulócitos: (D) - Monócito, (E) - Linfócito [adaptado de (8)].

### 2.1.3.1 Linfócitos

Os linfócitos são células mononucleares com 6 a 14  $\mu\text{m}$  de diâmetro (3). O citoplasma do linfócito consiste exclusivamente num fino anel quase impercetível ao redor do núcleo (**Figura 4**) (1). Aproximadamente 75% dos linfócitos do sangue periférico são células T. Entre 10 e 15% dos linfócitos são células B e as restantes 10-15% são linfócitos granulares grandes (LGL) (3).



**Figura 4:** Linfócito [adaptado de(3)].

Embora tenham origem na medula óssea, os linfócitos migram através do sangue até aos tecidos linfáticos nomeadamente gânglios linfáticos, baço, amígdalas e timo, onde proliferam e produzem mais linfócitos (1).

As células B podem ser estimuladas por bactérias ou toxinas para se dividirem, formando células que produzem anticorpos, os quais são glicoproteínas destinadas a ligarem-se aos antígenos específicos levando à sua destruição. As células T protegem contra vírus atacando e destruindo células onde estes se produzem. Além disso, as células T estão envolvidas na destruição de células tumorais e na rejeição de enxertos (1, 2).

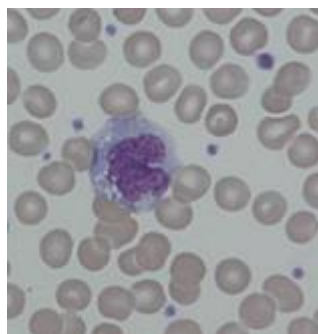
Os LGL são maiores do que a média dos linfócitos e incluem as células *natural killer* (3), que fazem parte da imunidade inata que lisam células tumorais e células infectadas por vírus (1).

A contagem elevada de linfócitos no sangue periférico (linfocitose) está muitas vezes associada a infecções virais, mas também pode ser observada em algumas infecções bacterianas e doenças malignas hematológicas (3).

### 2.1.3.2 Monócitos

Os monócitos são tipicamente as maiores células leucocitárias com 12 a 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro (1). Os monócitos têm um núcleo irregular, ou em forma de C, com um citoplasma azul-acinzentado e um pequeno número de grânulos azurófilos (**Figura 5**), cujo conteúdo desempenha um papel importante na degradação das partículas ingeridas (3).

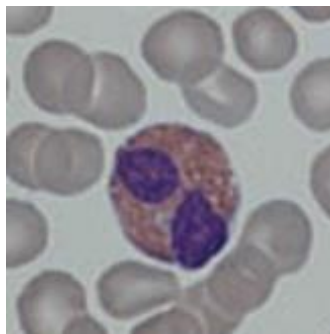
Os monócitos não são células efectoras, normalmente permanecem em circulação durante 2 a 3 dias e depois abandonam-na, transformando-se em macrófagos e migrando para os vários tecidos (1). Os monócitos complementam a função de defesa contra agentes invasores dos neutrófilos (3).



**Figura 5:** Monócito [adaptado de (3)].

### 2.1.3.3 Eosinófilos

Os eosinófilos têm uma dimensão de 11 a 14  $\mu\text{m}$  e representam 3% dos leucócitos. Têm um núcleo bilobado e um citoplasma composto por grânulos de grande dimensão (**Figura 6**) (1, 3). Nos grânulos dos eosinófilos destacam-se quatro proteínas: a peroxidase eosinofílica, a proteína básica principal, a proteína catiónica eosinofílica e neurotoxina derivada de eosinófilos. Os grânulos também armazenam diversas citocinas, enzimas e fatores de crescimento (9).



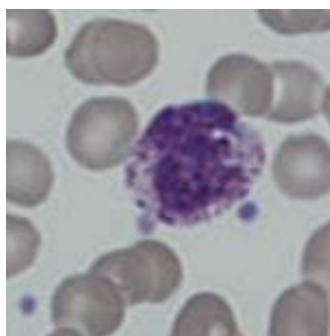
**Figura 6:** Eosinófilo [adaptado de (3)].

Os eosinófilos são conhecidos como sendo importantes mediadores de reações alérgicas (hipersensibilidade) e desempenham um papel fundamental na destruição de vários parasitas (3). Apesar da maioria dos parasitas serem demasiadamente grandes para serem fagocitados por qualquer célula fagocitária, os eosinófilos têm a capacidade de se ligar aos parasitas através de moléculas de superfície específicas e libertarem substâncias capazes de eliminar ainda mais parasitas, como espécies reactivas de oxigénio (ROS), enzimas hidrolíticas e proteína básica principal (2).

Em algumas parasitoses e em doenças alérgicas o número de eosinófilos no sangue aumenta (eosinofilia). A eosinofilia está associada a algumas anomalias, incluindo alergias, reações medicamentosas, infeções por helmintes, síndrome de Churg-Strauss, algumas neoplasias, distúrbios metabólicos, distúrbios gastrointestinais eosinofílicos e síndrome de hipereosinofilia (10).

#### **2.1.3.4 Basófilos**

Os basófilos são os menos comuns dos leucócitos no sangue periférico (0,5 a 1%) e têm entre 10 a 12  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Têm um núcleo bilobular e o citoplasma é rico em grânulos que coram de azul-escuro, como mostrado na **Figura 7**. Os grânulos são geralmente tão grandes e numerosos que obscurecem o contorno do núcleo (1-3).



**Figura 7:** Basófilo [adaptado de (3)].



Os basófilos normalmente circulam na corrente sanguínea e, em certas condições patológicas, tais como doenças alérgicas e infecções por parasitas, são recrutados para os tecidos periféricos, embora em pequenas quantidades (11).

Os basófilos podem ser ativados por uma série de sinais incluindo os mediados por anticorpos [imunoglobulinas (Ig) E, IgG e IgD)], citocinas [interleucina (IL) 3 (IL-3), IL-18 e IL-33), proteases, ligandos e fatores do complemento (12). Uma vez ativados são capazes de produzir uma série de fatores excretados como as citocinas IL-4, IL-13, IL-6, fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e linfopoetina estromal tímica (TSLP). Além disso, libertam mediadores pré-formados, armazenados nos seus grânulos como a histamina, leucotrieno C4 (LTC4), péptidos antimicrobianos e fatores quimiotáticos que recrutam células imunitárias (12). Subsequentemente, estas células regulam as respostas alérgicas e imunológicas do organismo (11).

Os basófilos existem num número muito reduzido no nosso organismo porque, como respondem a vários estímulos e libertam modeladores imunológicos, um número elevado destas células pode provocar distúrbios homeostáticos no sistema imunitário e levar a uma anafilaxia sistémica (11).

### **2.1.3.5 Neutrófilos**

No final do séc. XIX, Paul Ehrlich, descobriu os neutrófilos, quando as técnicas de fixação e coloração celulares tornaram possível a identificação dos núcleos lobados e a presença dos grânulos citoplasmáticos, característicos destas células. A coloração de tais grânulos a partir de corantes neutros conferiu a estes leucócitos a denominação de “neutrófilos” (13).

Nos seres humanos, os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa contra uma grande diversidade de ameaças incluindo bactérias (14), vírus (15), protozoários (16) e fungos (17).

#### **2.1.3.5.1 Morfologia**

Os neutrófilos, também denominados por polimorfonucleares têm um diâmetro de cerca de 7-10  $\mu\text{m}$  e um núcleo segmentado (18) com 3 a 5 lóbulos ligados por finas pontes de heterocromatina (3).

O citoplasma dos neutrófilos apresenta três tipos de granulações: os grânulos primários ou azurófilos (lisossomas), os grânulos secundários e os grânulos terciários (18). Os grânulos azurófilos, por serem os primeiros a aparecer durante a maturação,

contêm grandes quantidades de mieloperoxidase (MPO), enzima responsável pela produção de ácido hipocloroso (HOCl), uma ROS com grande poder antimicrobiano. Os grânulos secundários ou específicos não contêm MPO, mas contêm a sua própria seleção de proteínas antimicrobianas, incluindo a lactoferrina. Esta proteína afeta direta ou indiretamente as bactérias através da remoção de ferro do meio (elemento essencial ao crescimento das bactérias). Os grânulos terciários contêm a enzima elastase, envolvida na degradação de material estranho proveniente da fagocitose (19, 20). Além dos grânulos e vesículas, os neutrófilos contêm um elevado número de mitocôndrias, alguns retículos endoplasmáticos e reservas de glicogénio, que lhes fornecem energia necessária aos seus movimentos (19).

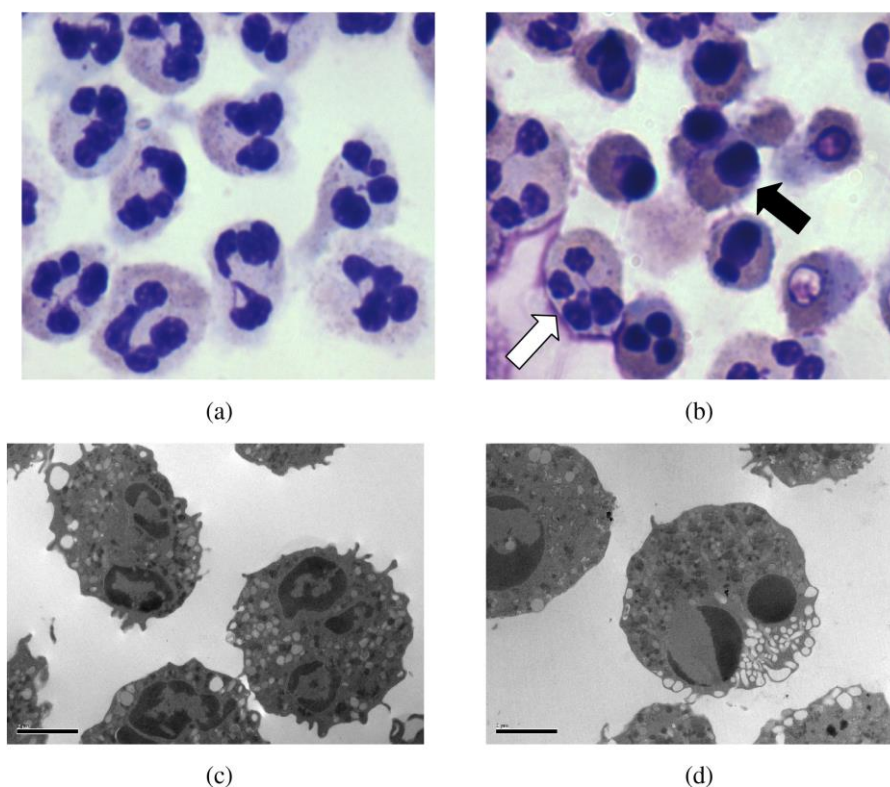
#### **2.1.3.5.2 Ciclo de vida**

Os neutrófilos são formados no interior da medula óssea durante a hematopoiese, a partir de células hematopoiéticas pluripotentes que se diferenciam em mieloblastos, uma célula em desenvolvimento responsável pela formação de granulócitos (1, 13, 21). O processo de granulopoiese (maturação dos granulócitos) demora cerca de 5-6 dias (3) e são gerados neutrófilos a uma taxa de  $10^{11}$  por dia, o que pode aumentar para  $10^{12}$  por dia durante uma infeção. Cerca de 55% a 60% da produção da medula óssea diz respeito à formação de neutrófilos (22). Se estas células não forem implicadas no processo inflamatório, têm um tempo de vida na circulação extremamente curto, de cerca de 6 a 10 horas, entrando em apoptose espontânea, permitindo assim, a manutenção de um balanço homeostático destas células. Este equilíbrio é importante porque, embora eficazes na sua capacidade destrutiva, a sua atividade excessiva também pode ser perigosa para as células do hospedeiro. A apoptose é uma forma de morte celular programada dependente da energia, tendo um nítido contraste com a necrose onde ocorre uma morte celular descontrolada e não-programada, associada à rutura da membrana celular e ao derrame do conteúdo intracelular (23). A exposição de fosfatidilserina (PS) na superfície extracelular dos neutrófilos leva ao seu reconhecimento por fagócitos (24), que assim podem cessar a resposta inflamatória sem libertar moléculas citotóxicas que prejudicariam tecidos do hospedeiro (25). Os neutrófilos em apoptose inicial podem entrar em apoptose tardia ou em necrose secundária, quando a membrana plasmática se torna permeável (24).

Durante o processo apoptótico ocorre uma cascata de eventos que se podem dividir em duas vias diferentes mas convergentes: a via intrínseca e a via extrínseca. A via de sinalização intrínseca é mediada pela mitocôndria, e caracteriza-se pela ocorrência de

alterações no transporte de elétrons e perda de potencial da membrana mitocondrial. Esta perda de potencial da membrana permite a libertação de ativadores das caspases como o citocromo c (26). A via extrínseca ou dos recetores de morte provoca a morte celular após a ligação dos recetores de morte da superfície celular como o TNF- $\alpha$  e o ligando Fas (Fas L) (26, 27).

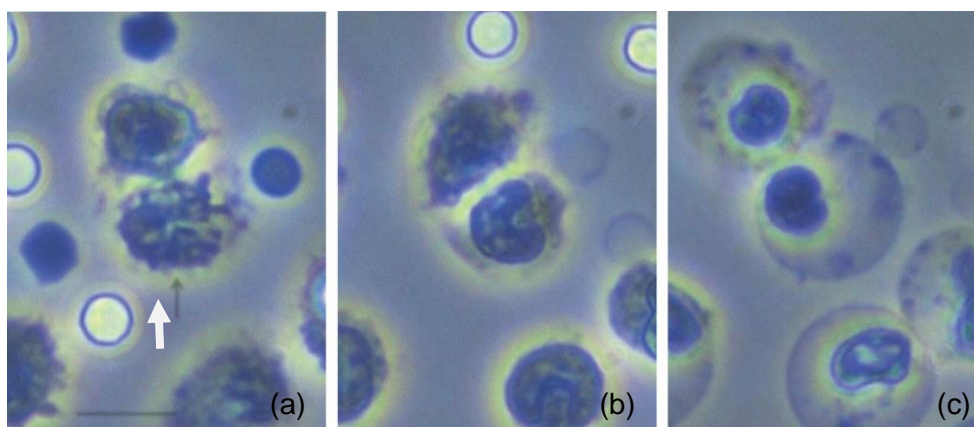
Os neutrófilos contêm caspases, que são proteases que utilizam um resíduo de cisteína como o nucleófilo catalítico e partilham especificidade para clivar os seus substratos a seguir aos resíduos de ácido aspártico (28). Existem dois tipos de caspases. Caspases iniciadoras (por exemplo, caspases -8, -9 e -10), que são ativadas através das vias de sinalização da apoptose e ativam as caspases executoras (por exemplo, caspases -3, -6 e -7), que numa cascata culminam em apoptose (23). A apoptose é um processo com características bem definidas, incluindo contração celular, vacuolização, condensação nuclear, fragmentação do DNA, reorganização da membrana do plasma, sendo que a integridade da membrana plasmática permanece (**Figura 8**) (23).



**Figura 8:** Imagem por microscopia ótica composta MOC. (ampliação 1000x) de neutrófilos humanos: (a) isolados recentes (b) isolados após cultura de 24 horas (h). Estão representados neutrófilos com morfologia apóptótica (seta preta) e neutrófilos viáveis (seta branca). Em (c) e (d) as imagens são de microscopia eletrônica de isolados frescos e em cultura após 24h, respetivamente (2100x) (23).

Outro tipo de morte celular dos neutrófilos é a necrose. Note-se que numa fase inicial, os neutrófilos podem sofrer oncosse culminando em necrose devido à exposição a bactérias ou outras toxinas. Os granulócitos apoptóticos podem sofrer necrose secundária, caso não sejam eliminados por macrófagos em tempo devido (29).

A necrose também apresenta diversas características que, quando consideradas no total, podem delinear uma sequência de eventos intracelulares específicos para a morte celular. Tal sequência inclui os primeiros sinais de disfunção mitocondrial; ou seja, a produção de ROS pela mitocôndria e dilatação das mitocôndrias; depleção de trifosfato de adenosina (ATP); falha da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$ ; agrupamento perinuclear de organelos; ativação de algumas proteases, em particular calpaínas e catepsinas; rutura lisossomal que leva a acidificação do citoplasma; e, finalmente, rutura da membrana plasmática (**Figura 9**) (30, 31). A necrose em granulócitos é considerada altamente prejudicial para a resolução da inflamação, devido à libertação dos seus conteúdos tóxicos para o ambiente, causando mais danos e perpetuando a resposta inflamatória. Além disso, a necrose de granulócitos permite aos patogénicos escaparem da fagocitose pelos neutrófilos (29).

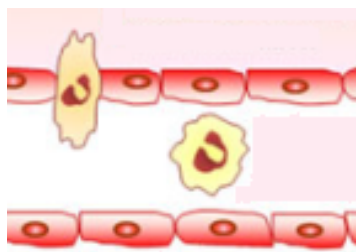


**Figura 1:** Alterações morfológicas em neutrófilos necróticos. O núcleo lobulado (seta) (a) funde-se e torna-se redondo e compacto (b). As células necróticas em fase terminal apresentam a membrana celular comprometida (c) [adaptado de (32)].

#### 2.1.3.5.3 Função

A principal função dos neutrófilos é reconhecer, fagocitar e eliminar agentes patogénicos (13). Nos seres humanos, os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa contra uma grande diversidade de ameaças incluindo bactérias (14), vírus (15), protozoários (16) e fungos (17) e atuam em consonância com os linfócitos e macrófagos (19).

Estas células, quando expostas a vários tipos de estímulos ficam ativadas e deixam a circulação aderindo às células endoteliais. Por rolamento, marginação e diapedese passam dos capilares sanguíneos para o tecido conjuntivo (**Figura 2**). Uma vez no tecido de sustentação, os neutrófilos chegam até ao local afetado por quimiotaxia. A quimiotaxia é um processo unidirecional, mediado por estímulos químicos, que provoca o movimento das células para um determinado local (3). Ao encontrar a partícula ou microrganismo invasor, ocorre um processo denominado fagocitose, no qual, os neutrófilos fazem o reconhecimento, através da interação entre recetores específicos na membrana dos neutrófilos com ligandos presentes na superfície do agente invasor e em seguida, emitem pseudópodes que se fundem em torno do invasor, formando o fagossoma (2, 13, 33).

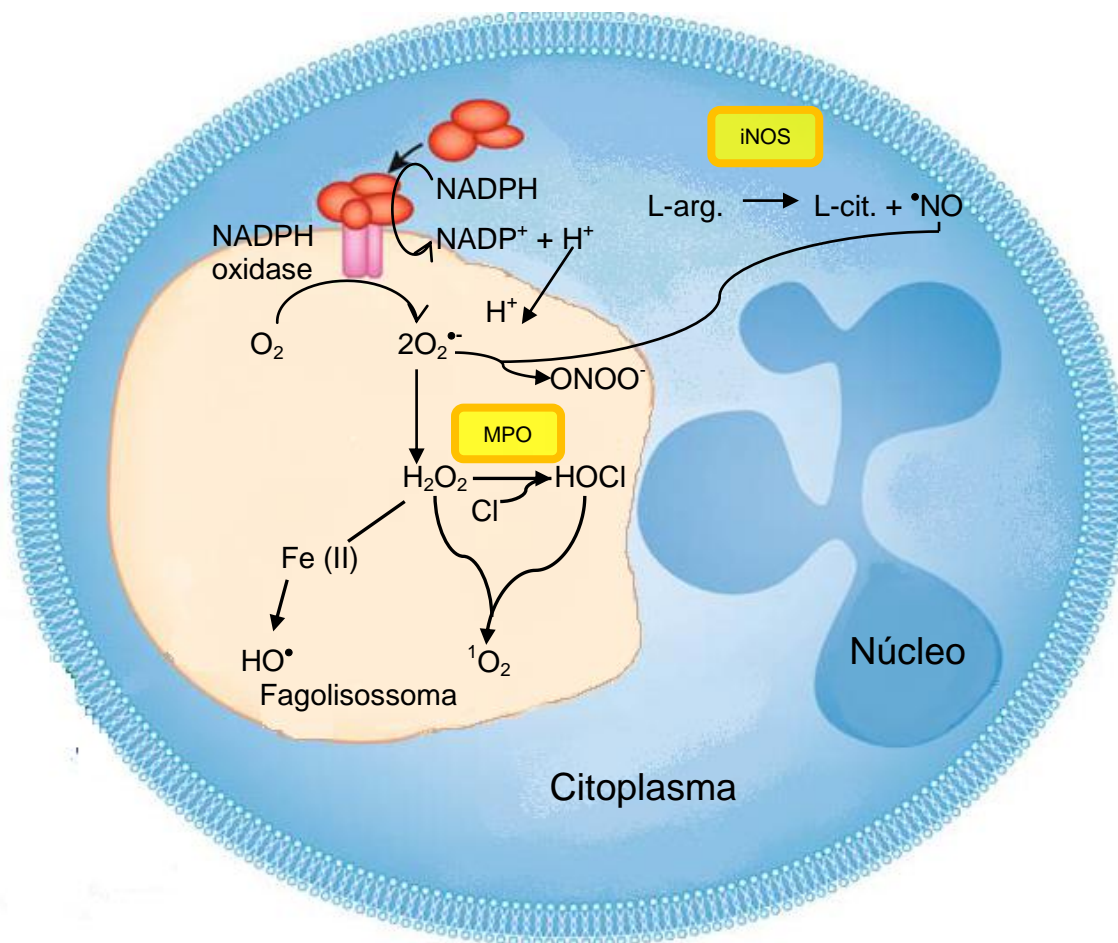


**Figura 2:** Imagem representativa de neutrófilos em diapedese [adaptado de (34)].

No interior da célula, ocorre a fusão do fagossoma com grânulos citoplasmáticos, formando-se o fagolisossoma. Dentro deste ocorrem vários processos no sentido de eliminar o agente agressor (13, 33, 35, 36), nomeadamente, a libertação de peptídeos antimicrobianos pela desgranulação, acidificação do meio, criando-se um ambiente hostil que impede o crescimento microbiológico, ocorre também a produção de ROS e espécies reativas de azoto (RNS) (**Figura 11**) (37).

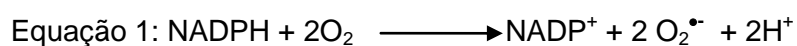
Em condições fisiológicas as ROS e RNS são geradas de forma basal, verificando-se um aumento da sua produção em vários processos de agressão ao organismo, nomeadamente em processos inflamatórios, envolvendo além dos neutrófilos, macrófagos e eosinófilos (38). Estas espécies são de extrema importância no combate a agentes invasores (38). No entanto, o seu excesso está associado ao denominado stresse oxidativo, que se pode definir como um desequilíbrio entre espécies pró-oxidantes e antioxidantes a favor das primeiras, num sistema biológico (39). Os alvos maioritários do stresse oxidativo a nível celular são a membrana celular (inativação de enzimas e alterações do transporte transmembranar), o citoplasma e os seus constituintes (proteínas e lípidos) e, fundamentalmente, o DNA do núcleo das células eucarióticas (mutagénese). As doenças cardiovasculares, a carcinogénese e o

envelhecimento são exemplos representativos de consequências que decorrem do stresse oxidativo (39).

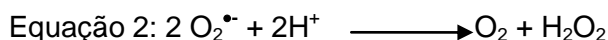


**Figura 11:** Esquema representativo da produção de ROS e RNS pelos neutrófilos durante a fagocitose [adaptado de(25)].

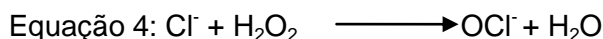
A produção de espécies reactivas nos neutrófilos inicia-se após ativação da enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidase. Esta enzima é bastante complexa sendo constituída por várias subunidades, algumas das quais presentes no citoplasma, as quais, após ativação, ligam-se aos componentes da membrana plasmática. Esta associação resulta num complexo ativo que oxida o NADPH no lado citoplasmático da membrana, reduzindo o O<sub>2</sub> no espaço extracelular e originando o anião radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (Equação 1) (40).



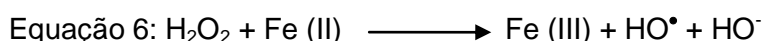
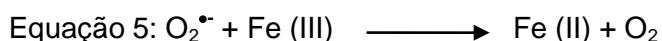
A produção de  $O_2^{\bullet-}$  por este sistema enzimático funciona como precursor de muitas outras espécies reativas essenciais no processo de defesa contra agentes agressores (41). O  $O_2^{\bullet-}$ , por sua vez, é convertido em peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) espontaneamente ou pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD) (presente nos microrganismos fagocitados), segundo a Equação 2 (41, 42). O superóxido também pode ser convertido em oxigénio singuleto ( $^1O_2$ ), segundo a Equação 3 (42).



O  $H_2O_2$  é o substrato da enzima MPO, presente nos grânulos primários dos neutrófilos. Esta enzima, na presença de iões cloreto, catalisa a conversão do  $H_2O_2$  (Equação 4) numa espécie mais reativa, o HOCl que é simultaneamente oxidante e clorante, sendo mais tóxico que o  $O_2^{\bullet-}$  (42).

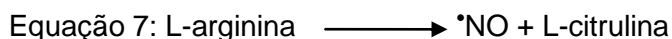


Outra espécie radical resultante do  $H_2O_2$  é o radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ). Este radical reage com quase todas as biomoléculas conhecidas e resulta da reação do Fe (II) com o  $H_2O_2$  de acordo com o ciclo de Haber-Weiss (Equação 5 e 6), em que a reação de Fenton representa um importante papel.



Outros radicais que se podem formar a partir do oxigénio são os radicais peroxinitrilo ( $ROO^{\bullet}$ ), dos quais, o mais comum é o radical hidroperóxido ( $HOO^{\bullet}$ )(42).

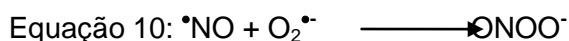
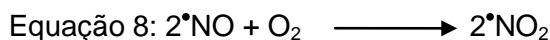
Os neutrófilos também podem produzir RNS, como o óxido nítrico ( $^{\bullet}NO$ ) (Equação 7) cuja produção depende da atividade da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) (42).



A forma NOS indutível (iNOS) é produzida por neutrófilos estimulados e assim que a expressão de iNOS aumenta, o  $^{\bullet}NO$  é continuamente produzido por longos períodos (42). O  $^{\bullet}NO$  é muito instável e na presença de  $O_2$  pode dar origem a outras espécies como o dióxido de azoto ( $^{\bullet}NO_2$ ) (Equação 8) e óxido nitroso ( $N_2O_3$ ) (Equação 9). Além



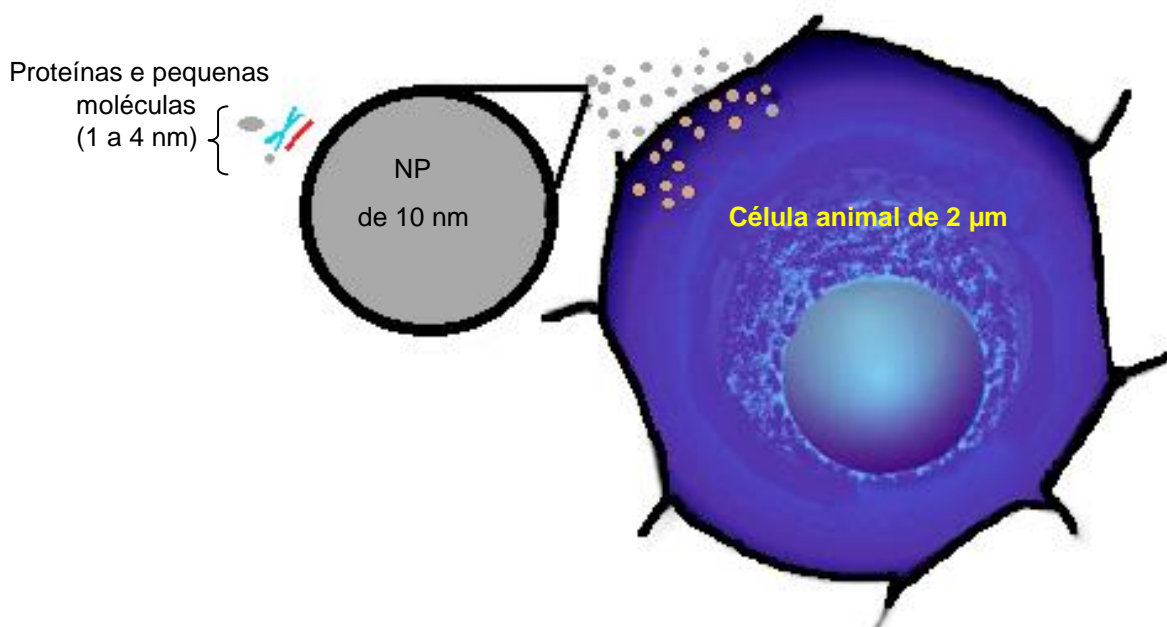
destas estas espécies, o  $\cdot\text{NO}$  ao reagir com o  $\text{O}_2\cdot^-$ , origina uma espécie muito citotóxica, o anião peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (Equação 10).



Para a eliminação de agentes invasores, além da produção de espécies reativas, os neutrófilos podem libertar proteínas granulares e cromatina que formam armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), que degradam fatores de virulência e ligam-se matando as bactérias num microambiente contido (13, 36, 43).

## 2.2 Nanopartículas de prata

A nanotecnologia é uma ciência que estuda materiais em nano-escala (escala atômica), ou seja, estruturas menores do que 100 nm (44, 45). Tal como se pode verificar na **Figura 12**, uma célula chega a ser mil vezes maior em volume e tamanho, em comparação com uma nanopartícula (NP) de 10 nm (44).



**Figura 12:** Comparação de tamanho entre proteínas e pequenas moléculas, NPs de 10 nm e uma célula animal [adaptado de (44)]



As NPs têm propriedades físicas e químicas singulares que resultam da elevada quantidade de átomos presentes na superfície e da sua elevada relação área/volume (46, 47).

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar e tem sido utilizada em aplicações tão diversas como cosmética, têxteis, eletrónica, ótica, agricultura, matérias para engenharia (48, 49).

As nanopartículas de prata (AgNPs) são as NPs mais utilizadas devido às suas inúmeras aplicações (50-52) e por isso serão o foco de incidência desta dissertação. A base de dados do centro Woodrow Wilson dos Estados Unidos, apesar de não ser muito exaustiva, listou 1015 produtos no mercado contendo NPs, dos quais, 250 são constituídos por AgNPs (**Tabela 1**) (53). Estes dados revelam a elevada utilização destas NPs pela população em geral. As AgNPs possuem propriedades físico-químicas muito características, incluindo a sua flexibilidade, maleabilidade e uma condutividade térmica e elétrica elevada em relação a qualquer outro metal (54). Caracterizam-se pela sua estabilidade química, atividade catalítica e um comportamento ótico não linear. Estas propriedades conferem um imenso potencial em tintas, microeletrónica e imagiologia médica. No entanto, é o largo espectro de atividade antimicrobiana da prata e o custo relativamente baixo de obtenção de AgNPs que as torna extremamente populares numa vasta gama de produtos de consumo incluindo plásticos, sabonetes, adesivos, metais e têxteis (53).

**Tabela 1:** Principais produtos no mercado contendo AgNPs (53).

<b>Produtos com AgNPs</b>	<b>Percentagem</b>
<b>Cremes e cosméticos</b>	32.4
<b>Suplementos alimentares</b>	4.1
<b>Têxteis e vestuário</b>	18.0
<b>Filtros de ar e água</b>	12.3
<b>Utensílios domésticos</b>	16.4
<b>Detergentes</b>	8.2
<b>Outros</b>	8.6

O facto de a prata ser um metal amplamente utilizado há milhares de anos na história da Humanidade, também contribui para a sua grande aplicabilidade (54).

Hipócrates proclamou as propriedades medicinais da prata, nomeadamente o facto de poder curar enfermidades múltiplas. Durante séculos, as diferentes formas de prata foram utilizadas no tratamento de queimaduras e feridas (55).

Contudo, descobriu-se que a pigmentação irreversível da pele e/ou dos olhos – argíria (**Figura 13**), podia desenvolver-se devido à exposição prolongada à prata ou a compostos constituídos por prata. Devido a este problema e juntamente com a introdução da penicilina na década de 1940, o uso da prata diminuiu drasticamente (55, 56).



**Figura 13:** Pigmentação azul acinzentada característica da argíria (57).

Mais tarde, a resistência dos microrganismos aos diferentes antibióticos e o desenvolvimento de métodos de síntese de AgNPs mais simples revitalizou o interesse neste valioso agente antimicrobiano. A prata possui atividade biocida contra mais de 650 organismos patogénicos (bactérias, fungos e vírus) (56) e o avanço da ciência moderna e da nanotecnologia ajudou a renovar a sua importância. As aplicações das AgNPs continuam a ser amplamente estudadas, devido às suas notáveis características antimicrobianas (54), que estão associadas com a oxidação e libertação lenta de iões prata ( $\text{Ag}^+$ ) para o ambiente, tornando-as num agente biocida ideal.

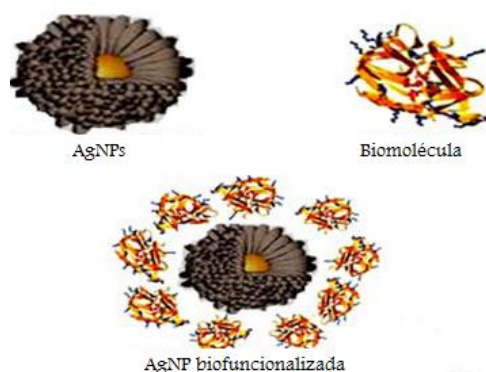
### **2.2.1 Síntese, revestimento e caracterização**

A nanotecnologia e a química de síntese moderna têm sido utilizadas para desenvolver métodos de síntese no sentido de melhorar o desempenho das NPs. O desafio para os investigadores é desenvolver um processo de síntese de NPs em que se obtenha um melhor controlo sobre o tamanho, distribuição, morfologia, pureza, quantidade e qualidade das NPs, utilizando processos económicos e que não sejam prejudiciais ao meio ambiente (58).

A redução química é o método mais frequentemente utilizado para a síntese de AgNPs. Baseia-se num processo de redução que se divide em dois passos, permitindo um melhor controlo do tamanho das NPs. Nesta técnica, um agente redutor forte é utilizado para produzir partículas pequenas de prata, as quais são ampliadas num passo secundário por redução com um agente redutor mais fraco (59, 60). São usados como redutores o hidreto de boro, o citrato e o ácido ascórbico (53). A síntese de NPs por métodos de redução química é realizada na presença de agentes estabilizadores, tais como o dodecil sulfato de sódio (SDS), a polivinilpirrolidona (PVP) e o citrato tri-sódico, a fim de evitar a aglomeração da solução coloidal de AgNPs, que pode resultar na alteração das suas propriedades iniciais (61, 62).

Embora as NPs possuam excelentes propriedades físicas e químicas, não possuem propriedades de superfície adequadas para certas aplicações (63). Para evitar a agregação e a aglomeração das NPs, são utilizados agentes estabilizadores, dos quais se destacam compostos com grupos tiol, conjuntos de polímeros ou estruturas dendríticas e o encapsulamento em microemulsões (64). Estes agentes estabilizadores não só protegem as NPs da precipitação, mas também desempenham um papel crítico no tamanho, distribuição, morfologia e biocompatibilidade das mesmas. A PVP é considerada uma excelente estabilizadora polimérica para as AgNPs. No caso de partículas com diâmetros inferiores a 50 nm, o azoto em PVP coordena as ligações com a prata de forma a criar uma camada de proteção. Outros polímeros foram investigados como moléculas estabilizadoras de AgNPs que incluem poliacrilatos, polietilenoglicol (PEG), álcool polivinílico, poliacrilonitrilo, poliácridamida (64), carbono em espuma, albumina sérica bovina (BSA) e sulfonato de sódio-2-mercaptoetano (MES) (47). Os revestimentos biológicos também constituem uma opção e podem incluir anticorpos, biopolímeros, tais como o colagénio, ou monocamadas de pequenas moléculas (65). As biomoléculas promovem a biocompatibilidade das AgNPs (**Figura 14**), facilitando a sua utilização como biossensores, em imagiologia e tratamentos de hipertermia (66). Uma enorme variedade de moléculas orgânicas de diferentes composições, tamanho e complexidade estão disponíveis na natureza e proporcionam a estrutura e funcionalização para os vários processos biológicos (63).

A caracterização das NPs é importante para se compreender e controlar não só o processo de síntese bem como, as suas aplicações. As comparações entre os estudos e as generalizações que permitem o uso posterior de dados são difíceis de concretizar se as AgNPs não estiverem devidamente caracterizadas (53).



**Figura 14:** Biofuncionalização de AgNPs [adaptado de (63)].

O primeiro passo para a caracterização é determinar se as AgNPs foram realmente sintetizadas. A análise do tamanho, forma e quantidade também é importante. Para a determinação destes parâmetros utilizam-se variadas técnicas, incluindo a microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de varrimento e microscopia eletrônica de transmissão (TEM), espectroscopia de absorção e dispersão dinâmica de luz (DLS) (67).

A morfologia e o tamanho das partículas podem ser determinados por TEM, microscopia eletrônica de varrimento e AFM. A técnica de DLS é mais utilizada para a determinação da distribuição das NPs (67).

A TEM proporciona o acesso não só ao tamanho e morfologia das NPs, mas também ao seu estado de agregação, constituindo por isso uma técnica muito utilizada na caracterização de NPs. No entanto, para uma melhor caracterização terá de ser utilizada juntamente com outras técnicas pois o processamento da amostra exigido para TEM pode alterar as propriedades de superfície das NPs (68).

A técnica de espectroscopia de UV-Vis é amplamente utilizada para a caracterização de AgNPs já que para além de dar informação acerca do tamanho médio das NPs e dispersão é um método de baixo custo e de fácil manuseamento (68).

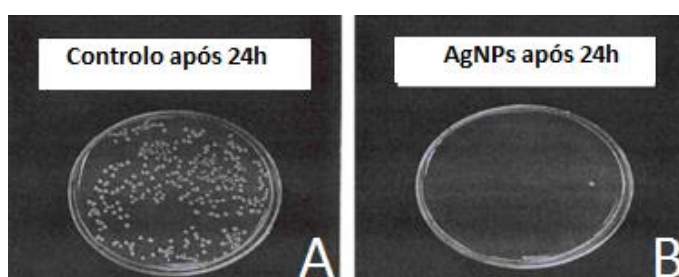
Um outro fator importante na caracterização das AgNPs é a sua estabilidade. O potencial zeta é utilizado para caracterizar a propriedade de carga da superfície das NPs, que reflete o potencial elétrico das partículas e é afetado pela composição da superfície das mesmas, a presença ou ausência de compostos adsorvidos e a composição da solução de dispersão, principalmente a força iónica e o pH. NPs com um potencial zeta acima de (+/-) 30 mV demonstraram ser estáveis pois a carga da superfície impede a sua agregação (69).

## 2.2.2 Aplicações

As AgNPs, devido às suas propriedades específicas, têm inúmeras aplicações, sendo as mais populares as antimicrobianas.

### AgNPs como antibacterianos, antifúngicos e antivirais

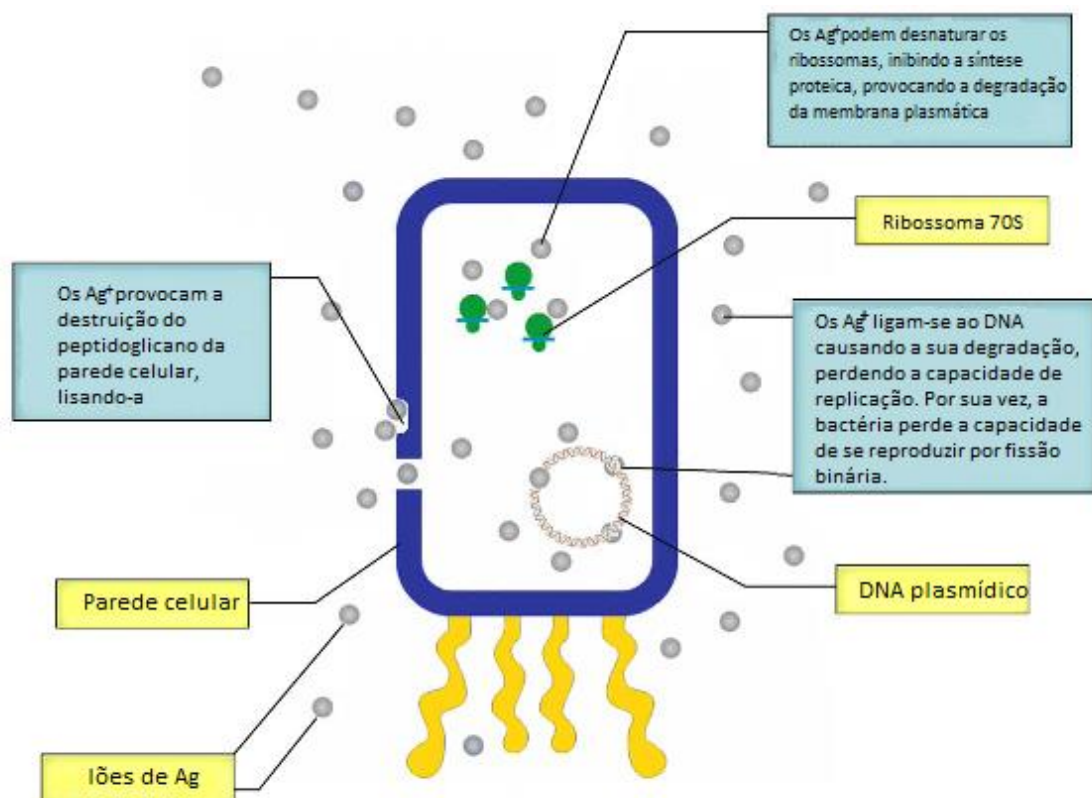
O espectro antibacteriano das AgNPs é mais amplo do que o dos antibióticos comuns. Como tal, as AgNPs representam uma nova geração de antimicrobianos, capazes de destruir bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (50) (**Figura 15**).



**Figura 15:** Controlo (A) e efeito antibacteriano (B) (*E. coli*) das AgNPs ao fim de 24h [adaptado de (61)].

As AgNPs são também capazes de inibir a formação de biofilmes nas superfícies revestidas com as mesmas (70) e têm baixa propensão para induzir resistência microbiana. Assim sendo, têm sido aplicadas numa vasta gama de produtos antimicrobianos para prevenção de infeções, como pensos para queimaduras e feridas traumáticas, revestimento de cateteres, trabalhos odontológicos, próteses e dispositivos médicos (51). Devido às suas propriedades antimicrobianas, as AgNPs também podem ser incorporadas em máquinas de lavar roupa e filtros para purificação de água de consumo e água de piscinas (71). Além disso, esta propriedade incentiva a indústria têxtil a usar AgNPs em diferentes tipos de tecidos (54). São inclusivamente já utilizadas em meias para eliminar as bactérias associadas aos maus odores dos pés. Também podem ser usadas na indústria alimentar (71).

O mecanismo de ação da atividade antimicrobiana das AgNPs não está bem definido, mas é amplamente aceite que possa ser mediado pela oxidação parcial das AgNPs e libertação de  $\text{Ag}^+$ . Por sua vez, os  $\text{Ag}^+$  podem interagir com o peptidoglicano da parede celular e a membrana plasmática, causando lise celular; com o DNA bacteriano (citoplasmático), impedindo a replicação do DNA; e com proteínas bacterianas, interrompendo a síntese proteica (**Figura 16**). As AgNPs também podem danificar as bactérias diretamente por penetração na parede celular e membrana celular (61).

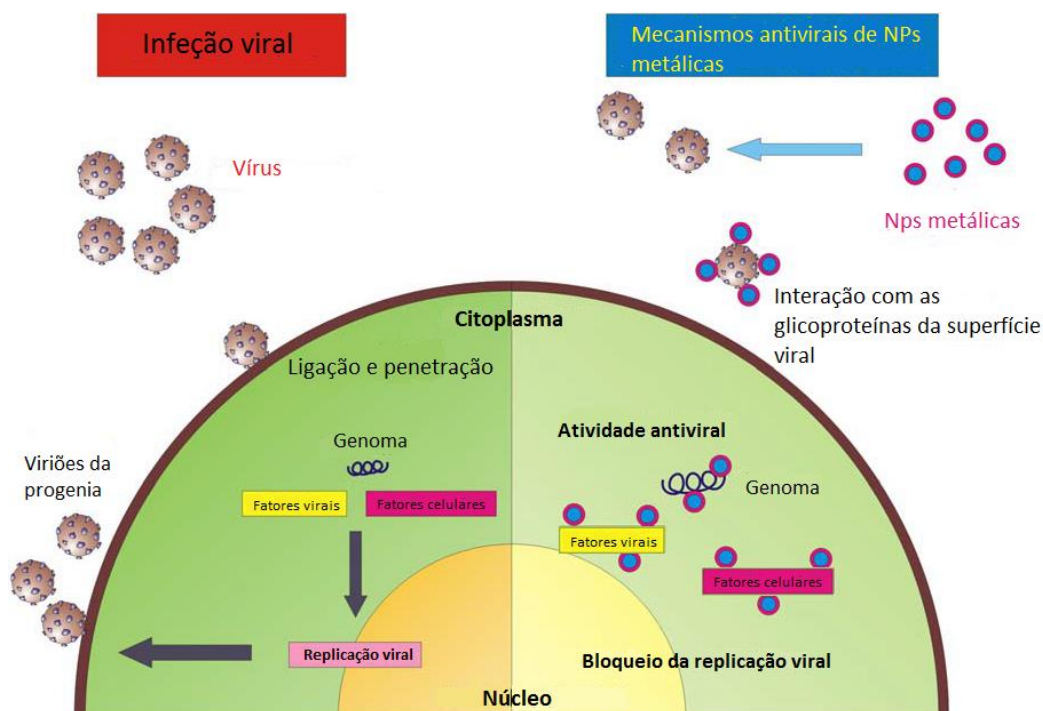


**Figura 16:** Mecanismos da atividade antibacteriana de íons de prata [adaptado de (61)].

As AgNPs também apresentam considerável atividade antifúngica contra géneros como *Aspergillus* (72), *Candida* (73) e *Fusarium* (74). Além disso, as AgNPs são eficazes contra as leveduras isoladas de mastites bovinas (75) e também contra vários fungos fitopatogénicos (76). Os resultados de um estudo de Kim e colaboradores sugerem que a atividade antifúngica das AgNPs passa pela alteração da estrutura da membrana celular do fungo e consequente inibição do processo de gemulação normal (77).

As AgNPs também se têm mostrado ativas contra vários tipos de vírus, incluindo o vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) (78, 79), vírus H1N1 *Influenza A* (80), vírus da hepatite B (HBV) (81) e vírus *Herpes simplex* (HSV) (82). Uma vez que as AgNPs podem atacar uma vasta gama de alvos no vírus, existe uma menor possibilidade de desenvolver resistência, em comparação com antivirais convencionais. Para além da interação direta com as glicoproteínas da superfície viral, as NPs metálicas podem ter acesso ao interior da célula e exercer a sua atividade antiviral através de interações com o genoma viral [DNA ou ácido ribonucleico (RNA)]. Além disso, o compartimento intracelular de uma célula infetada com um vírus está sobrelotado de fatores celulares que são necessários para permitir a replicação viral e a produção adequada de viriões da prole. A interação de NPs metálicas com estes

fatores, que são a chave para uma replicação viral eficiente, pode também representar um novo mecanismo de ação (**Figura 17**) (47).



**Figura 17:** Modelo esquemático da infecção de uma célula eucariótica por um vírus e o mecanismo de ação antiviral das NPs metálicas [adaptado de (47)].

### AgNPs como anti-inflamatórios

A cicatrização ocorre após uma sequência de eventos, incluindo a coagulação, inflamação, proliferação e remodelação da matriz e do tecido. A resposta inflamatória durante o processo de cicatrização induz a produção de mediadores que promovem o processo de cura (83). Embora as citocinas sejam cruciais na iniciação, manutenção e regulação da resposta pós-lesão, estas mesmas moléculas têm sido implicadas na cura deficiente de feridas, formação de cicatriz anormal e resposta inflamatória descontrolada (83).

Pela análise bibliográfica, Tian e seus colaboradores sugerem que a inflamação pode ser prejudicial para o processo de cicatrização (83).

Estes autores analisaram a ativação de algumas citocinas envolvidas no processo de cicatrização de queimaduras, num modelo de rato, durante 30 dias após a lesão. As diferenças entre os níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-6, fator  $\beta 1$  de transformação do crescimento (TGF- $\beta 1$ ) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)] analisadas no local da ferida e a nível sistêmico e as anti-inflamatórias IL-10 e interferon  $\delta$  (IFN- $\delta$ ) confirmaram que as AgNPs podem modular a expressão das



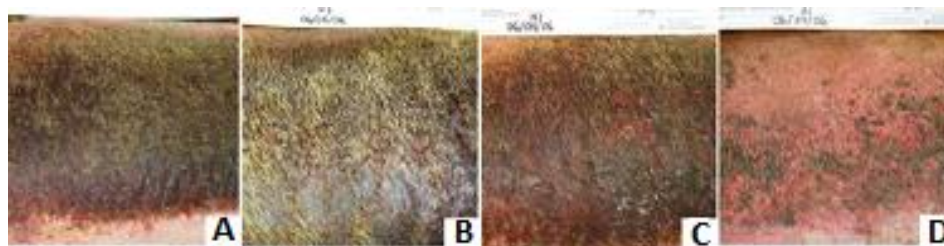
citocinas de uma forma dependente da dose, diminuindo assim a inflamação e diminuindo também a cicatriz (83).

A atividade anti-inflamatória de um creme tópico com AgNPs também foi avaliada num modelo murino de dermatite de contacto alérgica. Os investigadores verificaram que o creme com AgNPs era o que reduzia visivelmente o eritema, de uma forma dependente da concentração, quando comparado com esteroides e imunossuppressores. Também foi verificada a inibição da expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e de IL-12 e a indução da apoptose em células envolvidas no processo inflamatório (84).

Num estudo com um modelo suíno de dermatite de contacto, induziu-se inflamação e recorreu-se seguidamente a um tratamento diário com pensos de AgNPs. Verificou-se, após análise do eritema, edema e dados histológicos que os suínos tratados com as AgNPs tinham a pele com características próximas das normais após 72h, enquanto os outros grupos de tratamento permaneceram com inflamação (**Figura 18**). A diminuição da inflamação no grupo tratado com AgNPs foi associada ao aumento da apoptose de células inflamatórias, a uma diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias e uma diminuição da atividade da gelatinase (85).

Considerados em conjunto, estes resultados sugerem que as AgNPs podem estar envolvidas na alteração ou supressão de eventos inflamatórios nas fases iniciais da cicatrização de feridas, bem como a utilização de AgNPs podem ser clinicamente aplicável a outras doenças (86), como as infeções por *Chlamydia trachomatis*. Yilma e colaboradores sugerem que as AgNPs podem ser aplicadas no tratamento da clamídia, pois uma característica da infeção é a indução de respostas inflamatórias severas, as quais desempenham papéis críticos na sua patogénese. Os autores verificaram a regulação de vários mediadores inflamatórios e sugerem que o efeito anti-inflamatório das AgNPs não é generalizado, mas sim altamente seletivo, dependendo assim do tipo de patogénico ou das células expostas (87). Pela análise bibliográfica, existem vários estudos que evidenciam a capacidade das AgNPs modularem a expressão das citocinas de uma forma dependente da dose, diminuindo assim a inflamação e a aparência da cicatriz. Tian e colaboradores sugerem que a inflamação pode ser prejudicial para o processo de cicatrização da ferida, por isso analisaram a ativação de algumas citocinas envolvidas no processo de cicatrização de queimaduras, num modelo de rato, durante 30 dias após a lesão onde confirmaram que as AgNPs podem modular a expressão das citocinas de uma forma dependente da dose, diminuindo assim a inflamação e a aparência da cicatriz (83-85).





**Figura 18:** Imagens representativas da evolução da cicatrização dos grupos de tratamento. A- Dia 0, B- Dia 3 com solução salina, C- Dia 3 com nitrato de prata, D- Dia 3 com AgNPs [adaptado de (85)].

Apesar de vários estudos relatarem que as AgNPs poderem induzir a inflamação, a interação direta entre AgNPs e neutrófilos que são os intervenientes mais importantes na inflamação, está mal documentada. No entanto, observou-se que AgNPs causam dano mitocondrial, resultando em indução de apoptose e morte de macrófagos (88). Um estudo de Poirier e colaboradores demonstrou que AgNPs de 20 nm aumentaram o tamanho das células de neutrófilos humanos recentemente isolados e rapidamente interagiram com a membrana celular e penetraram no interior das células, induziram a apoptose celular e inibem a síntese de novo de proteínas apenas quando presentes como grandes agregados (> 500 nm) (89).

### **AgNPs como antitumorais**

O cancro é uma das doenças do século XXI, e constitui um desafio terapêutico para os investigadores e médicos.

Um dos fatores chave para o crescimento e disseminação das células tumorais é a angiogénese, que é o processo de formação de novos vasos sanguíneos e capilares a partir de pré-existentes. Os vasos sanguíneos fornecem oxigénio e outros nutrientes para as células tumorais, permitindo-lhes crescer, migrar e metastizar para diferentes órgãos. A angiogénese tumoral é predominantemente provocada por mitogénios específicos endoteliais, tais como o VEGF, fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e fator  $\beta$  de transformação do crescimento (TGF- $\beta$ ). Existem inúmeras moléculas anti-angiogénicas em diferentes fases de ensaios clínicos, muitas delas foram aprovadas como terapêuticas do cancro. Infelizmente, alguns destes agentes demonstraram sinais de toxicidade (90).

Pesquisas focadas no uso anti-angiogénico das AgNPs revelaram que poderiam atuar como moléculas anti-angiogénicas potentes. As AgNPs foram capazes de bloquear completamente a permeabilidade de células endoteliais da retina de suíno induzida por VEGF e IL- 1 $\beta$  (91). Gurunathan e colaboradores demonstraram *in vivo*,

em ratinhos, que as AgNPs podem inibir a proliferação celular, a migração e a formação de novos microvasos, induzidos por VEGF (92).

### **AgNPs como regeneradoras**

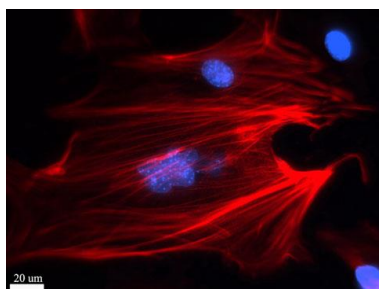
No campo da medicina regenerativa, nomeadamente na reparação de pele e do tecido ósseo utilizando nanomateriais, foram realizados trabalhos de investigação intensiva para tentar acelerar a cicatrização de feridas e a recuperação da função mecânica (93).

Em 1998 foram introduzidos no mercado pensos com AgNPs. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que estes pensos melhoram a cicatrização de feridas, devido à sua potente atividade antimicrobiana e anti-inflamatória (50).

Por exemplo, Wright e colaboradores, em 2002, examinaram os primeiros eventos da cura e a eficácia de pensos com AgNPs em relação aos níveis de metaloproteinases da matriz e a cicatrização num modelo suíno de feridas contaminadas. Verificaram que o produto com AgNPs promovia a cicatrização rápida nos primeiros dias após a lesão e o ambiente proteolítico nas feridas tratadas com as AgNPs foi modificado pela redução dos níveis de metaloproteinases da matriz. Em úlceras crónicas, os níveis de metaloproteinases da matriz demonstraram ser pró-inflamatórias e em níveis anormalmente elevados em comparação com feridas agudas. Isto pode contribuir para a natureza não-cicatrizante dessas feridas. Os pensos com AgNPs facilitam a fase precoce da cicatrização de feridas (94).

Idealmente, a pele reparada deve ser idêntica à pele normal a nível estético e a nível funcional, o que requer que na pele reparada não sejam só restauradas as suas estruturas anatómicas normais, mas que atinja um nível aceitável funcionalmente (95).

Estudos *in vitro* e *in vivo* revelaram que as AgNPs podem promover a proliferação de queratinócitos no processo de reepitelização e também conduzem a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos para a diminuição da ferida (**Figura 19**) (96).



**Figura 19:** Coloração imunocitoquímica de miofibroblastos diferenciados de fibroblastos embrionários de ratinhos sob a influência de AgNPs (96).

Um estudo adicional demonstrou que a função mecânica da pele tratada com AgNPs tinha melhores propriedades elásticas, deposição de colagénio, assim como o alinhamento das fibrilas de colagénio com uma estreita semelhança com a pele normal (95). Com base nestes resultados, o grupo concluiu que as AgNPs eram predominantemente responsáveis pela regulação e deposição de colagénio e a sua utilização pode trazer mais-valias no processo de cicatrização de feridas (95).

### **AgNPs como catalisadores**

Sabe-se que o aumento da proporção dos átomos da superfície aliado à diminuição do tamanho das partículas torna as pequenas partículas de metal altamente reativas (97).

A catálise é uma área chave no desenvolvimento de produtos químicos e a utilização de NPs como catalisadores tem atraído imensa atenção nos últimos anos, pois estes catalisadores podem ser seletivos, eficientes e recicláveis, preenchendo os requisitos de uma catálise verde (98). Por esse motivo, o desenvolvimento de novos métodos de síntese de NPs e a sua aplicação catalítica em novas reações é um campo de pesquisa amplo.

Estudos recentes mostraram que as AgNPs catalisam eficazmente algumas reações redox como a oxidação do monóxido de carbono (99), a oxidação do estireno para epóxidos e aldeídos (100, 101), a oxidação do ciclo-hexano a ciclo-hexanol (102), a redução do p-nitrofenol a p-aminofenol (103), a redução do mercúrio (II) a mercúrio elementar na presença de peróxido de hidrogénio(104) e a oxidação do etanol (105).

Na revisão de Sinbutin é referido que, um campo inexplorado para os catalisadores de prata pode ser a remoção de poluentes em águas residuais ou no ar (97). Sendo a redução do p-nitrofenol a p-aminofenol (103) importante neste campo, pois a presença de compostos fenólicos em águas residuais pode ser preocupante devido à sua toxicidade (106). Já o p-aminofenol é um importante intermediário na síntese de medicamentos e tem outras aplicações como revelador de fotografias, inibição da corrosão de pinturas, aditivo em combustíveis e na síntese de corantes (107, 108).

## **2.2.3 Toxicidade**

### **Nanotoxicologia**

A nanotoxicologia, como o nome indica, estuda a toxicidade dos nanomateriais, e em que medida a sua utilização pode representar uma ameaça para o meio ambiente e para a saúde humana (109). Surgiu apenas recentemente, anos depois do

aparecimento da nanotecnologia, quando vários nanomateriais já haviam sido introduzidos no mercado (110).

A produção de NPs em grande escala e a eliminação inadequada de resíduos pode levar à sua acumulação na natureza e consequentemente elevar a exposição humana. Para aumentar a complexidade deste problema, a maioria dos nanomateriais metálicos parecem não ser biodegradáveis e permanecer na natureza e nos tecidos durante anos. A fim de ter o pleno aproveitamento das vantagens da nanotecnologia, a biocompatibilidade e o perfil toxicológico das NPs deve ser estabelecido (111).

### **Toxicidade *in vitro* de AgNPs**

Os sistemas de modelos *in vitro* fornecem um meio rápido e eficiente para avaliar a toxicidade das NPs. Estes sistemas também fornecem informações refinadas sobre a forma como as NPs interagem com células humanas. Tais estudos podem ser usados para estabelecer relações de concentração/efeito e os limiares específicos para cada tipo de célula. Estes ensaios são adequados para o rastreio toxicológico de um número cada vez maior de novos nanomateriais obviando a necessidade de testes *in vivo* (112).

Os estudos *in vitro* representam assim, o primeiro passo para a compreensão de como o organismo vai reagir a um novo agente. Em comparação com estudos em animais, os estudos *in vitro* são menos eticamente ambíguos, são mais fáceis de controlar e reproduzir e são menos dispendiosos. No caso de citotoxicidade, é importante reconhecer que, além da concentração do agente potencialmente tóxico a ser testado, as células em cultura são sensíveis a alterações no seu meio ambiente, tais como as flutuações de temperatura, pH e concentrações de nutrientes. Por conseguinte, o controlo das condições experimentais é crucial para assegurar que a morte celular medida corresponde à toxicidade das NPs adicionadas e não a condições de cultura instáveis. Além disso, é importante que a escolha do ensaio de citotoxicidade seja apropriada e a realização de testes múltiplos é vantajosa para garantir conclusões válidas (113).

Na **Tabela 2** encontra-se reunida alguma informação relevante sobre o efeito tóxico das AgNPs, *in vitro*.

**Tabela 2:** Estudos sobre o efeito das AgNPs *in vitro*.

Linhas celulares	Doses (µg/mL)	Tamanho (nm)	Tempo de exposição (h)	Efeitos	Fonte
Células estaminais embrionárias e fibroblastos embrionários de rato visto	50	25	4-72	Danos no DNA e apoptose. AgNPs revestidas produzem efeitos mais graves do que as não revestidas.	(114)
Células de carcinoma epidermóide e fibrossarcoma humanos	6,25-50	7-20	24	Redução da viabilidade celular, stresse oxidativo, danos no DNA e grande atividade da caspase 3	(115)
Fibroblastos e células hepáticas de ratinho	10-500	7-20	24	Redução da viabilidade celular, stresse oxidativo e apoptose	(116)
Fibroblastos pulmonares e células de glioblastoma	25-400	6-20 revestidas com amido	24-72	Geração de ROS. Danos no DNA e atraso no ciclo celular o que leva posteriormente à apoptose.	(117)
Macrófagos alveolares de rato	10-75	15-55	24	Geração de ROS e stresse oxidativo mediado por toxicidade dependente do tamanho	(118)
Células humanas de hepatoma HepG2	0,5-10	5-10	28	Citotoxicidade e stresse oxidativo.	(119)
Linha celular da leucemia humana aguda monocítica (THP-1)	0-7,5	69	24	Geração de ROS e apoptose.	(120)
Células de adenocarcinoma cervical HeLa	92	2-5	3-24	Citotoxicidade, apoptose e indução de stresse oxidativo	(122)
Células estaminais mesenquimais humanas	2,5-5	100	24	A proliferação celular e a quimiotaxia diminuíram, enquanto a libertação de IL-8 aumentou.	(123)
Células neuroendócrinas de rato PC-12	5-50	15	24	Redução da função mitocondrial e do nível de dopamina.	(130)
Osteoblastos de rato MC3T3-E1 e PC12	0-160	10,50,100	24-72	Apoptose nas MC3T3-E1 e morte por necrose nas PC12. AgNPs de 10 nm mais tóxicas.	(127)
Células endoteliais coronárias do rato	0,1-100	45	24	A concentrações baixas, as AgNPs atuam como fatores anti-proliferativos / vasoconstritores que comprometem a produção de NO. A concentrações altas, as AgNPs estimulam a proliferação / vasorrelaxamento mediada por NO.	(121)
Células endoteliais do cérebro do rato	1-25	10- 100	1-24	Grandes danos na membrana. Proliferação celular foi inibida completamente à concentração mais baixa.	(124)
Fibroblastos de ratinho e células humanas de carcinoma do colon	5-100	1-100	24	As AgNPs atuam através de ROS e da cinase do terminal amínico de c-Jun (JNK) para induzir a apoptose pela via mitocondrial.	(125)

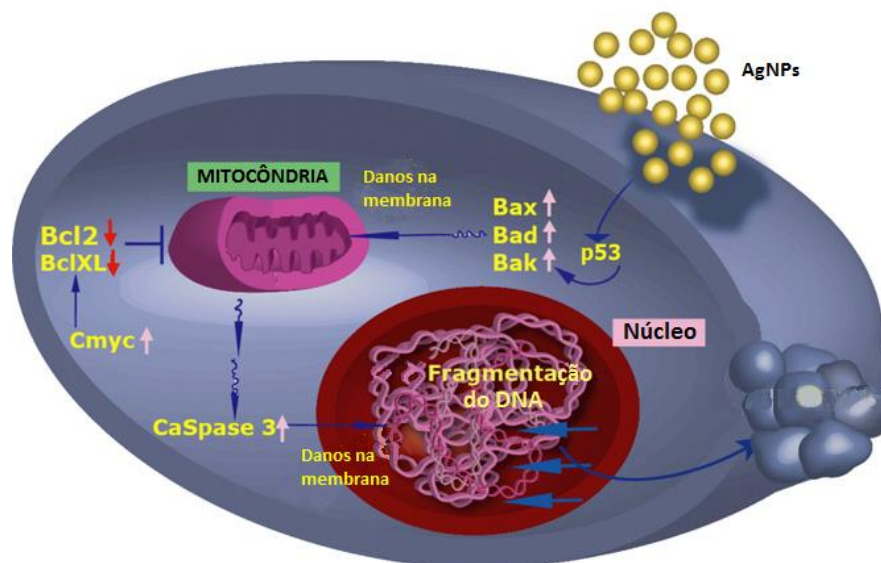
<b>Tabela 2</b> (Continuação)					
Células hepáticas de rato BRL3	5-50	25-100	6-24	Redução da função mitocondrial e do nível de glutatona reduzida (GSH) e aumento do nível de ROS.	(126)
Células humanas de hepatoma HepG2	0,1-3	7-10 com polietilenoimina (PEI)	24	Doses não citotóxicas de AgNPs aceleram os genes de reparação de danos do DNA e a indução de micronúcleos.	(128)
Células espermatogénicas de ratinho	5-10	15	24	Redução da função mitocondrial, aumento da lactato desidrogenase (LDH) e apoptose.	(114)
Células humanas de hepatoma HepG2	0,1-3	7-10 com polietilenoimina (PEI)	24	Doses não citotóxicas de AgNPs aceleram os genes de reparação de danos do DNA e a indução de micronúcleos.	(128)
Células renais de hamster bebé BHK21 e células humanas de adenocarcinoma do colon HT29	11	18	0,5-6	Indução de apoptose mediada pela p-53.	(129)
Queratinócitos humanos HEKs	0,34-1,7	20-80	24	Diminuição dependente da dose da viabilidade celular com NPs não revestidas, enquanto as revestidas com carbono foram não-tóxicas	(131)
Células de adenocarcinoma do pulmão A549	0-200	40-90	24-72	Geração de ROS com distúrbios da membrana mitocondrial. Inibição do ciclo celular com paragem na fase S (via independente de ROS)	(132)

Após análise da **Tabela 2**, verifica-se que o dano celular mais referido diz respeito à produção de ROS e consequentemente, stresse oxidativo. As doenças cardiovasculares, a carcinogénese e o envelhecimento são exemplos representativos de consequências que decorrem do stresse oxidativo (39).

Alguns estudos (114, 115, 117, 125) sugerem que a genotoxicidade constitui um outro mecanismo importante para a toxicidade induzida por AgNPs. A integridade do DNA genómico está constantemente sob ameaça, mesmo em células saudáveis. No geral, as alterações nocivas do material genético (genotoxicidade) incluem aberrações cromossómicas e mutações pontuais que envolvem uma mudança numa única base. Os danos no DNA ativam uma rede de sinalização complexa que funciona para ativar controladores do ciclo celular e mediar a reparação do DNA. As células retomam a progressão do ciclo celular, uma vez que o dano é reparado (133).

A destabilização da integridade mitocondrial por agentes genotóxicos, bem como citotóxicos levam à ativação de caspases que conduzem à apoptose. Está descrito na literatura que as AgNPs induzem toxicidade via ativação da cascata que resulta em

apoptose (129). A apoptose é bem reconhecida como um modo distinto de morte celular programada que envolve a eliminação geneticamente determinada de células. Durante o processo de morte celular programada, ocorre a ativação de proteínas proteolíticas como as caspases. As AgNPs parecem induzir a apoptose via ativação das caspases (116, 129). Uma representação esquemática do circuito apoptótico envolvido na morte das células tratadas com AgNPs é demonstrada na **Figura 20**.



**Figura 20:** Representação esquemática da indução da apoptose provocada pelas AgNPs [adaptado de (129)].

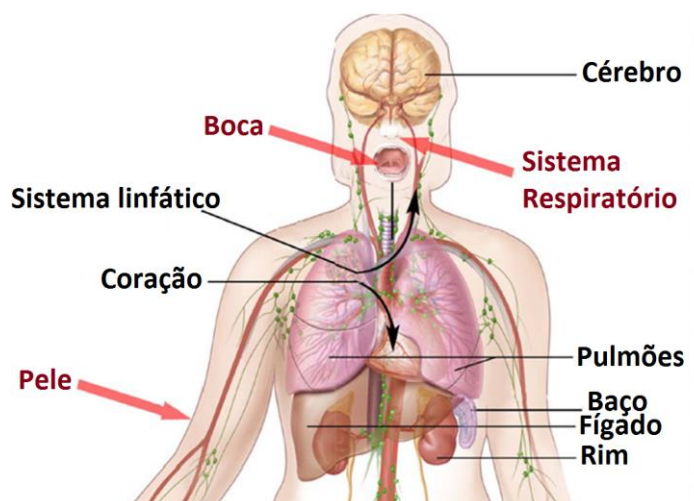
As AgNPs uma vez ligadas à membrana celular provocam danos na integridade da membrana e ativa a proteína p53. Por sua vez, a p53 ativa mediadores pró-apoptóticos como bax, bad e bak. Estas proteínas são conhecidas por causar danos na membrana mitocondrial libertando citocromo c, que numa reação em cascata, ativa a caspase-3. Finalmente, a caspase-3 cliva a membrana nuclear para induzir a fragmentação de DNA (129). Além de provocarem apoptose nas células, também se verificou morte por necrose (127).

### **Toxicidade *in vivo* de AgNPs**

Os estudos *in vitro* com AgNPs são essenciais para a avaliação dos efeitos toxicológicos e para o rastreio dos seus potenciais de toxicidade a longo prazo. No entanto, os ensaios *in vitro* não possuem a complexidade do sistema vivo, as interações biológicas com as proteínas, a resposta imunológica e barreiras fisiológicas, o que pode levar a falsas interpretações sobre a toxicidade das AgNPs (134).

Em geral, os estudos toxicológicos AgNPs têm-se centrado na avaliação da distribuição nos tecidos, após injeção intravenosa, exposição pulmonar, dérmica ou do trato gastrointestinal. Estes estudos fornecem informação útil sobre os potenciais órgãos alvo da toxicidade das NPs, contudo há ainda algumas questões por responder (112, 135). As alterações nas propriedades físico-químicas das AgNPs em fluidos biológicos, tais como o tamanho, a aglomeração, ou formação de agregados e carga de superfície têm de ser necessariamente verificados para determinar a sua toxicidade e para compreender o mecanismo de toxicidade. Os fatores fisiológicos que afetam a absorção, distribuição e excreção de NPs inorgânicas que dependem das vias de exposição, juntamente com o seu mecanismo de absorção e alvos biológicos, também devem ser considerados para uma melhor compreensão do potencial de toxicidade (134).

No corpo humano há essencialmente três vias de exposição a AgNPs: a pele, os pulmões e o trato digestivo. O trato genital feminino também pode constituir uma via de entrada, uma vez que as AgNPs são incorporadas em produtos de higiene femininos (54). Assim sendo, as AgNPs podem entrar e penetrar nesses órgãos, sendo que essa penetração depende do tamanho, forma e das características de superfície das NPs, bem como do órgão (histologias diferentes), da idade do consumidor e de outros agentes. A **Figura 21** mostra as principais vias de entrada das AgNPs e as áreas do corpo em que a exposição a NPs deve ser evitada (109).



**Figura 21:** Principais vias de entrada das AgNPs (vermelho) e partes do corpo cuja exposição a AgNPs deve ser evitada (a preto) [adaptado de (109)].

Após exposição, as AgNPs são capazes de passar para a circulação sanguínea e assim, se distribuírem pelo organismo, tal como demonstrado na **Tabela 3**.



O tamanho das partículas e a via de exposição afetam a sua distribuição pelos tecidos (136, 137). A eliminação de partículas ocorre essencialmente pelas fezes e urina (135).

**Tabela 3:** Distribuição nos tecidos das AgNPs segundo as várias vias de exposição.

Via de exposição	Tamanho das AgNPs (nm)	Distribuição nos tecidos por ordem decrescente de quantidade		Conclusões	Fonte
Oral	60	<b>Estômago</b> Fígado Rins Pulmões Testículos Cérebro Sangue		A absorção das AgNPs após administração oral foi demonstrada e a toxicidade no fígado foi sugerida.	(138)
Inalação	18-19	<b>Pulmões</b> Fígado Baço Cérebro		Translocação dependente da dose. Inflamação alveolar.	(139)
Inalação	4-10	<b>Pulmões</b> Fígado Rins Coração Cérebro		Translocação dependente do tempo e do tamanho. As NPs foram rapidamente eliminadas dos pulmões.	(137)
Injeção intravenosa	12-20	<b>Baço</b> Fígado Pulmões Rins		Toxicidade dependente do tempo e da concentração.	(140)
Injeção intravenosa	20-100	20 nm: <b>Fígado</b> Rins Baço	> 20 nm: <b>Rins</b> Baço Pulmões	Translocação dependente do tamanho.	(136)
Dérmica	Acticoat 15	<b>Plasma</b>		Concentração no sangue de 56,8 µgmL <sup>-1</sup> . Eliminação passados 6 meses	(141)
Dérmica	Acticoat 15	<b>Fígado</b> (hepatotoxicidade e argíria)		Hepatotoxicidade e argíria que desapareceram passados 7 meses	(142)

Devido ao facto de um grande número de produtos, contendo AgNPs, serem aplicados diretamente na pele, a avaliação das consequências de uma exposição cutânea é primordial. Atualmente, as investigações têm incidido sobre a eficiência de pensos que contêm AgNPs. No entanto, estão descritos resultados prejudiciais à saúde associados ao tratamento (141, 142), sendo necessários mais estudos para assegurar uma utilização mais segura.

As mesmas AgNPs podem ter comportamentos biológicos muito diferentes em pele ferida e em pele normal. É crucial definir os perigos associados à exposição dérmica às AgNPs, uma vez que o fígado é sugerido como o alvo de toxicidade (142-144).

Também a probabilidade de aparecimento da condição de argíria com este tipo de exposição, apesar de ser reversível (142), este tipo de resposta limita muito a utilização de produtos contendo AgNPs pelo consumidor, muitas vezes, por razões estéticas (135).

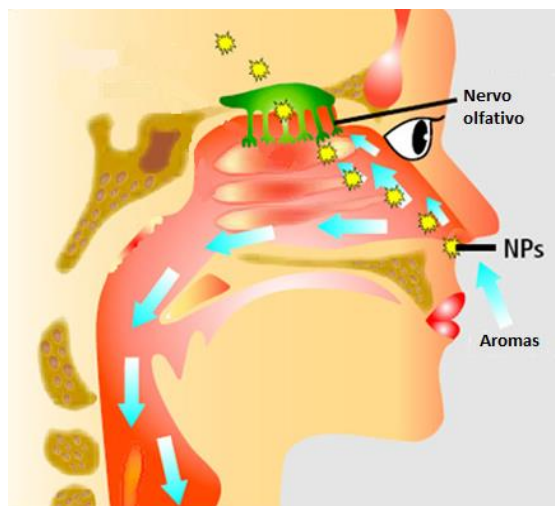
O estudo da ingestão oral de suspensões de AgNPs também é relevante uma vez que foi adotada como uma alternativa terapêutica para o tratamento de doenças como artrite e cancro. No entanto, estão descritos uma série de efeitos prejudiciais, associados à ingestão de suspensões de AgNPs, incluindo úlceras intestinais, argíria (145) e danos hepáticos (138, 145).

Uma preocupação poderá ser a bioacumulação já que em dois estudos por exposição por ingestão (147, 148) se verificou presença e permanência nos testículos e no cérebro.

O aumento da produção e utilização de AgNPs propicia a exposição humana, nomeadamente por inalação. Como tal, é imperativo entender a toxicidade destas NPs após exposição pulmonar. Contudo, esta abordagem não está muito explorada estando o foco dos estudos centrado na avaliação da disponibilidade sistémica de partículas, após exposição pulmonar (135).

Em estudos de exposição por inalação verificou-se toxicidade no fígado (149) e nos pulmões (139) além de que, se verificou acumulação de AgNPs em órgãos como o cérebro e o bolbo olfativo (139, 149), não se tendo conhecimento das consequências.

De acordo com Oberdörster e colaboradores, a presença de prata dentro do bolbo olfativo e no cérebro pode ter resultado da inalação das partículas, e da sua subsequente transferência para o bolbo olfativo pelos neurónios, como ilustra a **Figura 22** (150).



**Figura 22:** Passagem de NPs a partir da mucosa nasal para o cérebro através das terminações do nervo olfativo [adaptado de (109)].

Está descrito que a injeção intravenosa de AgNPs pode ser utilizada para o tratamento de algumas patologias (78, 151). Como tal, a avaliação da distribuição das AgNPs nos tecidos após administração intravenosa é de relevância, no sentido de se entender quais são os órgãos alvo que estão em maior risco de toxicidade. Está descrito que após a exposição por administração intravenosa, as AgNPs podem passar para a circulação sanguínea e serem distribuídas pelo organismo (136, 152).

Os estudos disponíveis permitem concluir que a toxicidade pulmonar e a disponibilidade sistêmica de AgNPs dependem do tempo de exposição, da concentração, do método de administração das NPs e do tamanho das mesmas (e aglomeração), o que ilustra a importância da montagem experimental, na toxicidade demonstrada após a exposição às partículas (135).

## 3. Material e Métodos

### 3.1 Materiais

O Histopaque 1077, Histopaque 1119, solução de azul tripano 0,4%, NaCl, solução de tampão fosfato salino (PBS) sem  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , RPMI 1640, soro fetal bovino,  $\alpha$ -glutamato, penicilina e estreptomicina, dihidrorodamina 123 (DHR), cloreto de difenileniodóico (DPI) e vermelho neutro (NR) 0,33% foram adquiridos à Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). O Annexin-V-FLUOS Staining Kit foi adquirido à Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemanha). O Hemacolor® foi obtido à Merck. As AgNPs de 10 e 50 nm, esféricas revestidas com PVP foram adquiridas à Nanocomposix (San Diego, Alemanha).

### 3.2 Equipamento

As leituras de espectrofotometria e fluorimetria foram realizadas em leitor de microplacas Synergy HT (BIO-TEK). As centrifugações foram efetuadas numa centrífuga 5810 R (Eppendorf). As leituras de citometria de fluxo foram realizadas num citómetro de fluxo BD Accuri™ C6. As leituras de microscopia ótica foram realizadas num microscópio ótico Eclipse E 400 (Nikon). Para a contagem das células utilizou-se uma câmara de Neubauer. Os cortes das amostras para microscopia eletrónica foram obtidos através de um micrótomo Leica Reichert Supernova, as células foram analisadas num microscópio eletrónico de transmissão JEM-1400, Jeol e as imagens obtidas através de uma câmara digital Orius® Sc1000CCD (Gatan). Foi ainda utilizada uma balança analítica AG285 (Metler Toledo).

### 3.3 Caracterização das AgNPs

Não foi realizada neste estudo caracterização adicional para além da realizada pelo fabricante, contudo, foi possível pela análise no TEM, confirmar o diâmetro nas NPs utilizadas neste estudo.

### **3.4 Isolamento de neutrófilos humanos pelo método de centrifugação de gradiente de densidade**

O sangue venoso foi obtido, após consentimento de voluntários saudáveis do Hospital de Santo António, Porto. Todos os ensaios foram precedidos de isolamento dos neutrófilos de todos os outros componentes do sangue humano através do método de centrifugação de gradiente de densidade.

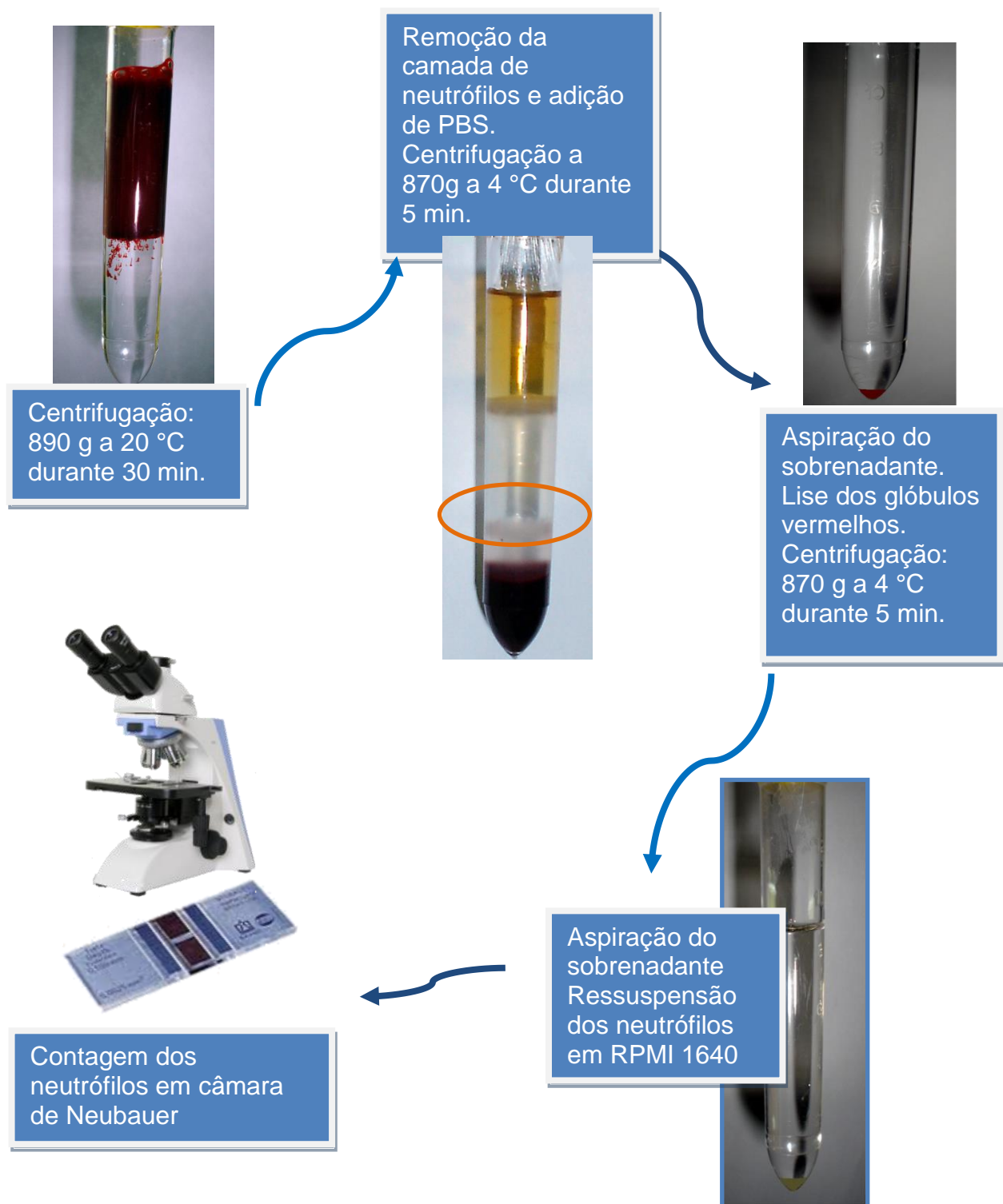
#### **3.4.1 Fundamento do método**

Os neutrófilos foram isolados do sangue pelo método de centrifugação de gradiente de densidade descrito por Freitas e colaboradores (153). Trata-se de um método que consiste na separação dos componentes do sangue segundo as suas diferentes densidades, ao ser aplicada uma força centrífuga.

#### **3.4.2 Procedimento experimental**

Para se isolarem os neutrófilos a partir do sangue humano pelo método de centrifugação de gradiente de densidade utilizaram-se duas soluções de diferentes densidades, Histopaque 1077 (densidade de 1,077) e Histopaque 1119 (densidade de 1,119). Estas soluções foram colocadas em quantidades iguais num tubo de polipropileno (material que evita a adesão das células à parede do tubo) ficando a mais densa por baixo e a menos densa por cima, tendo cuidado para não misturar. Por último, adicionou-se cuidadosamente o sangue [colhido num tubo de ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA) para evitar a coagulação]. Após uma centrifugação a 890 g, durante 30 min. a 20 °C, as células distribuem-se no tubo de acordo com a sua densidade (**Figura 23**). Rejeitou-se o sobrenadante e recolheu-se a camada referente aos neutrófilos para outro tubo de centrífuga, ao qual se adicionou tampão PBS sem  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  no sentido de se lavar as células e retirar o excesso de Histopaque. Seguiu-se uma centrifugação a 870 g durante 5 min. a 4 ° C. Descartou-se o sobrenadante resultante da centrifugação e ressuspendeu-se as células com solução tampão PBS sem  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Para eliminar a contaminação por glóbulos vermelhos, procedeu-se à hemólise dos mesmos, adicionando-se água destilada ( $\text{H}_2\text{O}_d$ ) à suspensão e aguardou-se cerca de três minutos, tempo após o qual é restabelecida a isotonia do meio adicionando NaCl 3% (m/v). Esta suspensão foi

novamente centrifugada nas mesmas condições, o sobrenadante foi rejeitado e os neutrófilos ressuspensos com solução tampão RPMI 1640 (suplementado com 10% de soro fetal de bovino, 2 mM de L-glutamato, 100 U/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina).



**Figura 23:** Esquema resumo do procedimento referente ao isolamento de neutrófilos humanos.

### 3.5 Método da exclusão do azul tripano

#### 3.5.1 Fundamento do método

O azul tripano é um corante orgânico, carregado negativamente. As células inviáveis, com danos na membrana, após alguns segundos de exposição ao corante ficam de cor azul (154).

#### 3.5.2 Procedimento experimental

Para a realização do ensaio do azul tripano, procedeu-se de acordo com Freitas e colaboradores (155). Após incubação na estufa a 37 °C com intervalos de tempo entre 0 e 24h em placa de 96 poços com neutrófilos humanos ( $2 \times 10^6$ /mL) e AgNPs (10 e 50 nm) com concentrações entre 0 e 100 µg/mL, adicionou-se quantidades iguais de suspensão celular e azul tripano 0,4% num microtubo e homogeneizou-se. Após permanência em gelo durante 2 min., com o auxílio de uma micropipeta, encheu-se a câmara de Neubauer e procedeu-se à contagem dos neutrófilos ao microscópio ótico (ampliação de 400x).

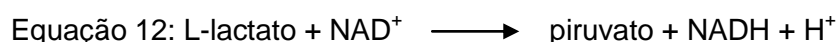
A determinação da viabilidade celular foi efetuada a partir da Equação 11:

$$\text{Equação 11: Viabilidade (\%)} = \frac{\text{número de neutrófilos viáveis}}{\text{número total de neutrófilos}} \times 100$$

### 3.6 Determinação da libertação da lactato desidrogenase

#### 3.6.1 Fundamento do método

A LDH é uma enzima citoplasmática presente em quase todos os órgãos com funções no último passo da glicólise, catalisando a reação reversível do piruvato a lactato segundo a Equação 12 (156, 157):



A perda da LDH intracelular e a sua libertação para o meio de cultura é um indicador da morte celular irreversível devido a danos na membrana da célula (158).

A velocidade de formação de NADH é diretamente proporcional à atividade catalítica da LDH e é determinada medindo a taxa de oxidação do mesmo a 340 nm.

### **3.6.2 Procedimento experimental**

O ensaio foi realizado de acordo com Couto e colaboradores (159). A incubação das células foi realizada numa estufa a 37 °C com intervalos de tempo entre 0 e 24h em placa de 24 poços com neutrófilos humanos ( $2 \times 10^6$  /mL) e de AgNPs (10 e 50 nm) com concentrações entre 0 e 100 µg/mL. No final do tempo de incubação, dividiu-se a amostra colocando-se em dois microtubos. Um dos microtubos foi utilizado para a determinação da LDH total, procedendo-se ao rebentamento das células por ultrassons em ciclos de 3 segundos. Todas as amostras foram centrifugadas a 6500 g durante 2 min. a 4 °C e o sobrenadante foi recolhido. A atividade de LDH foi determinada numa placa U.V. de 96 poços, em que cada poço continha sobrenadante, NADH 0,145 mM e piruvato 2 mM, seguindo a taxa de oxidação do NADH a 340 nm numa cinética de 4,30 min.

## **3.7 Método do iodeto de propídio**

### **3.7.1 Fundamento do método**

Os neutrófilos em necrose foram analisados por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídio (PI). A aplicação do PI permite a marcação das células com perda de integridade membranar, ou seja, células em necrose. Isto é possível dado que o PI se intercala na dupla cadeia do DNA emitindo fluorescência sendo esta medida por citometria de fluxo. Este marcador não consegue atravessar uma membrana citoplasmática intacta (160).

### **3.7.2 Procedimento experimental**

O procedimento experimental foi realizado de acordo com Freitas e colaboradores (155). Após incubação na estufa a 37 °C com intervalos de tempo entre 0 e 24h em placa de 48 poços com neutrófilos humanos ( $2 \times 10^6$  /mL) e AgNPs (10 e 50 nm) com concentrações entre 0 e 100 µg/mL, as células foram centrifugadas a 400 g durante 5 min. a 20 °C e os sobrenadantes foram rejeitados. Ressuspendeu-se o pellet em PBS e centrifugou-se a 200 g durante 5 min. a 20 °C. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em solução de PI preparada de acordo com as indicações do fabricante do kit Annexin-V-FLUOS Staining. Incubou-se no escuro à temperatura ambiente durante 15 min. e no final desse tempo adicionou-se tampão do kit. Procedeu-se à leitura no citómetro.



### 3.8 Método do NR

#### 3.8.1 Fundamento do método

O NR é um corante vital conhecido por se acumular nos lisossomas de neutrófilos viáveis. Este corante ligeiramente catiónico penetra nas membranas por difusão passiva e concentra-se nos lisossomas onde se liga por ligações eletrostáticas hidrofóbicas a grupos aniônicos e/ou fosfato à matriz lisossomal (161).

A absorção do NR depende da capacidade da célula em manter os gradientes de pH através da produção de ATP. A um pH fisiológico, o corante apresenta uma carga total perto de zero, permitindo a penetração nas membranas da célula. Dentro dos lisossomas, existe um gradiente de prótons que mantém o pH menor que no citoplasma. Assim, o corante fica carregado e é retido nos lisossomas. Quando a célula morre, ou o gradiente do pH é reduzido, o corante não pode ser retido. Consequentemente, a quantidade do corante retido é proporcional ao número de células viáveis. O corante é depois extraído das células viáveis através do uso de uma solução acidificada de etanol e a absorvência do corante solubilizado é quantificado utilizando um leitor de placas (161).

#### 3.8.2 Procedimento experimental

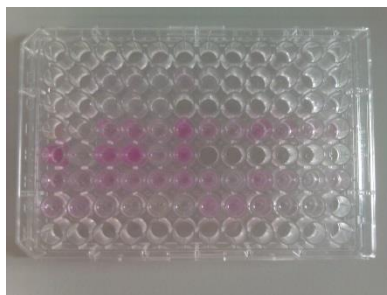
As condições do ensaio de incorporação do NR foram otimizadas de acordo com Repetto e colaboradores e Elifio-Esposito e colaboradores (162) (161). Após incubação na estufa a 37 °C com intervalos de tempo entre 0 e 16h em placa de 48 poços com neutrófilos ( $2 \times 10^6$  /mL), AgNPs (10 e 50 nm) com concentrações entre 0 e 100 µg/mL e NR (15 µg/mL), retirou-se o conteúdo dos poços para microtubos e centrifugou-se a 400 g durante 5 min. a 20 °C. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em PBS. Após nova centrifugação a 400 g durante 5 min. a 20 °C, rejeitou-se o sobrenadante e adicionou-se solução ácida (composta por solução de ácido acético glacial, etanol (100%) e H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>). Após incubação de 30 min. à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e com agitação, transferiu-se 300 µL para a placa de 96 poços (**Figura 24**) e leu-se a absorvência no leitor de placas a 540 nm (no máximo até 60 min.) após adição da solução ácida. O cálculo da percentagem da viabilidade celular foi feito de acordo com a Equação 13:

$$\text{Equação 13: Viabilidade (\%)} = \frac{\text{Absteste}}{\text{Abscontrolo}} \times 100$$

Em que:

Abteste, absorvência a 540 nm de culturas expostas ao composto

Abscontrolo, absorvência a 540 nm das respetivas culturas controlo



**Figura 24:** Placa de 96 poços onde se notam as gradações de cor devidas ao corante NR.

### 3.9 Análise morfológica por MOC

#### 3.9.1 Fundamento do método

A morfologia dos neutrófilos após exposição às AgNPs foi analisada utilizando o kit de coloração Hemacolor®. O kit de coloração Hemacolor® contém uma solução de fixação, uma solução de coloração vermelha (eosina) e uma azul (azur de metileno-azul de metileno oxidado). Após preparação das lâminas, e fixação das células, os núcleos dos neutrófilos coram de púrpura devido a interações moleculares entre a eosina e o azul, o que permite analisar a morfologia de células por MOC.

#### 3.9.2 Procedimento experimental

A avaliação da morfologia das células foi realizada de acordo com Couto e colaboradores (159). Após incubação na estufa a 37 °C com intervalos de tempo entre 0 e 16h em placa de 48 poços com neutrófilos humanos ( $2 \times 10^6$  /mL) e AgNPs (10 e 50 nm) com concentrações entre 0 e 100 µg/mL, retirou-se uma porção do conteúdo de cada poço e colocou-se no funil do sistema constituído pela lâmina, funil e suporte (**Figura 25**). As células foram centrifugadas numa citocentrífuga Cytospin a 641 g, durante 6 min. a 20 °C. Após centrifugação, os sistemas foram desmontados e recolheram-se as lâminas. As lâminas foram coradas com Hemacolor®, em que se mergulhou cada uma das lâminas 5 segundos no fixador, 3 segundos no corante eosina e 6 segundos no corante azul-escuro e lavou-se 20 segundos com tampão de lavagem. Após secagem das lâminas ao ar, foram visualizadas ao microscópio (ampliação de 1000x).



**Figura 25:** A: citocentrífuga B: Sistema constituído pela lâmina, funil e suporte.

## 3.10 Análise morfológica por TEM

### 3.10.1 Fundamento do método

O microscópio de transmissão permite obter imagens com grande resolução ao nível dos 3 nm. Em vez de utilizar luz visível e lentes óticas, como o microscópio ótico, utiliza um feixe de eletrões como fonte de iluminação e lentes eletromagnéticas para formar a imagem. O trajeto dos eletrões é de cima para baixo e, direcionado por um condensador, atravessa a amostra a analisar. Os eletrões deflectidos e não deflectidos pela amostra são focados pela lente objetiva, dando origem a uma imagem intermédia que é amplificada e projetada sobre um detetor, uma placa fluorescente (163).

### 3.10.2 Procedimento experimental

Após incubação na estufa a 37 °C durante 16h em placa de 48 poços com neutrófilos humanos ( $2 \times 10^6$ /mL) e AgNPs (10 e 50 nm) em concentrações de 0 e 100 µg/mL, as células foram fixadas em ambos os lados em 2% (v / v) com glutaraldeído em tampão de cacodilato (pH 7,2) durante 30 min., lavadas em tampão de cacodilato e ainda fixadas em 1% (v / v) de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) em tampão de cacodilato durante 2 horas. Após esse tempo, foi realizada uma coloração com 0,5% (v / v) de acetato de uranilo a 4 °C, durante a noite. Posteriormente, as amostras de células foram lavadas com água e, em seguida, desidratadas por graduação alcoólica com etanol. Após imersão no óxido de propileno, as células foram embebidas na resina Epon TM-812 e submetida à polimerização a 60 °C durante 48 horas. Cortes semi-finos e ultra-finos foram cortados com um ultra-micrótomo (Leica Reichert Supernova) e colocados em grelhas de cobre. As amostras foram coradas através de uma incubação em 5% (v / v)

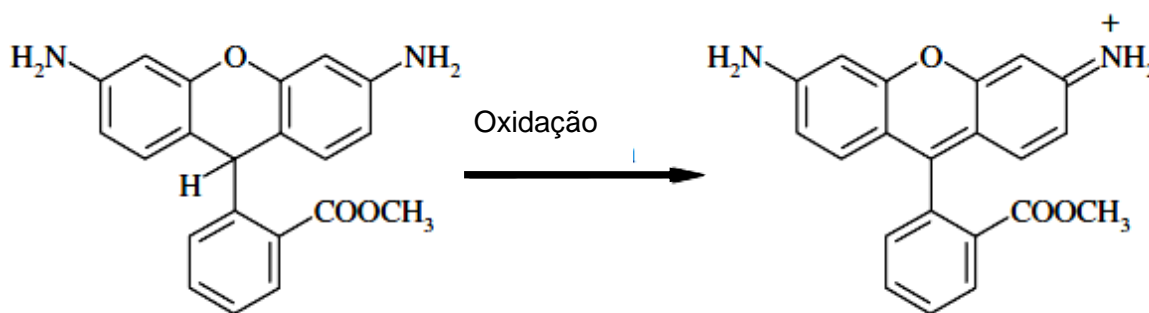
de acetato de uranilo e 0,8% (v / v) em soluções de citrato de chumbo de Reynold, de 5 e 10 min., respectivamente. As células foram analisadas com um TEM (JEM-1400, Jeol) e as imagens foram obtidas com uma câmara digital.

### 3.11 Avaliação do *burst* oxidativo dos neutrófilos

#### 3.11.1 Fundamento do método

A DHR é um composto não fluorescente que quando em contacto com algumas espécies reativas como o  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  e o  $ONOO^-$  é oxidada a rodamina 123 (R 123) exibindo fluorescência verde (**Figura 26**) (164).

O DPI é um inibidor da NADPH oxidase, uma das enzimas responsáveis pela produção de ROS (165). A sua utilização garante que a produção de espécies reativas se deve à atividade da NADPH oxidase.



**Figura 26:** Oxidação da DHR 123 a R 123 ( $\lambda_{excitação}$  505 nm  $\lambda_{emissão}$  529 nm) (166).

#### 3.11.2 Procedimento experimental

Os neutrófilos ( $2 \times 10^6/mL$ ) foram incubados na estufa a 37 °C com intervalos de tempo entre 0 e 4h em placa de 48 poços com DHR 123 (10  $\mu M$ ) e concentrações entre 0 e 100  $\mu g/mL$  de AgNPs (10 e 50 nm). Simultaneamente, foi realizado um ensaio em que os neutrófilos foram incubados com DPI e após 10 min. adicionou-se as AgNPs e a DHR 123. No final destas incubações, as células foram centrifugadas (400 g, durante 5 min. a 20 °C) e rejeitaram-se os sobrenadantes. Os pellets foram ressuspensos em 300  $\mu L$  de PBS e leu-se a fluorescência em leitor de microplacas ( $\lambda_{excitação}$  = 485 nm e  $\lambda_{emissão}$  = 520 nm).

### **3.12 Análise estatística**

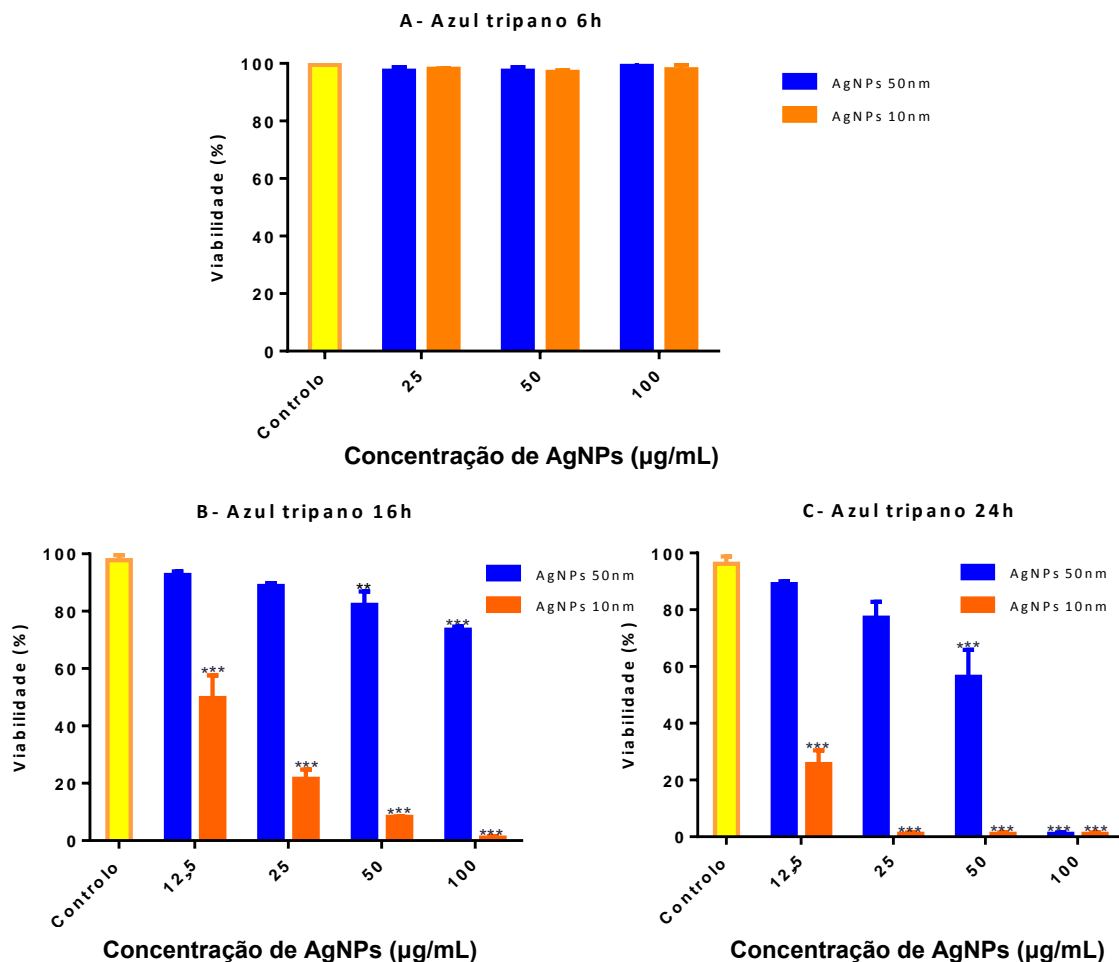
A análise estatística foi realizada através do programa GraphPad Prism™ (versão 6.0; GraphPad Software). Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). A comparação entre grupos foi realizada usando o método não paramétrico de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste Bonferroni. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

## 4. Resultados

### 4.1 Avaliação da viabilidade celular de neutrófilos humanos expostos a AgNPs

#### 4.1.1 Método de exclusão do azul tripano

Na **Figura 27** estão representados os resultados obtidos no estudo da viabilidade celular de neutrófilos humanos pelo método de exclusão do azul tripano ao fim de 6h (A), 16h (B) e 24h (C) de exposição às AgNPs de 10 e 50 nm (0-100 µg/mL).



**Figura 27:** Avaliação da viabilidade celular de neutrófilos humanos pelo método de exclusão do azul tripano, após exposição a AgNPs de 10 e 50 nm (0-100 µg/mL durante 6 (A), 16 (B) e 24h (C). Os valores são apresentados como a média  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ), \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , comparativamente ao controlo (sem AgNPs).

Pela análise da **Figura 27 (A)** verifica-se que, segundo este método, com uma incubação de 6h, não houve efeitos na viabilidade celular. No entanto, pela análise dos gráficos da **Figura 27 (B) e (C)**, verifica-se que às 16h, as AgNPs de 10 nm na concentração de 12,5 µg/mL originaram uma viabilidade celular de  $50 \pm 8\%$  (média  $\pm$  SEM) e na concentração de 100 µg/mL a viabilidade é nula. Após 24h de exposição a concentração de 12,5 µg/mL diminui a viabilidade celular para  $26 \pm 5\%$ , sendo que as concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL induziram 100% de morte celular. No caso das AgNPs de 50 nm observou-se inviabilidade com significado estatístico às 16h e às 24h a partir da concentração de 50 µg/mL, sendo que, às 24h com a concentração de 100 µg/mL a morte também foi total. Verifica-se assim, uma diminuição da viabilidade das células dependente do tempo de exposição, da concentração e do tamanho das NPs.

#### 4.1.2 Determinação da libertação de LDH

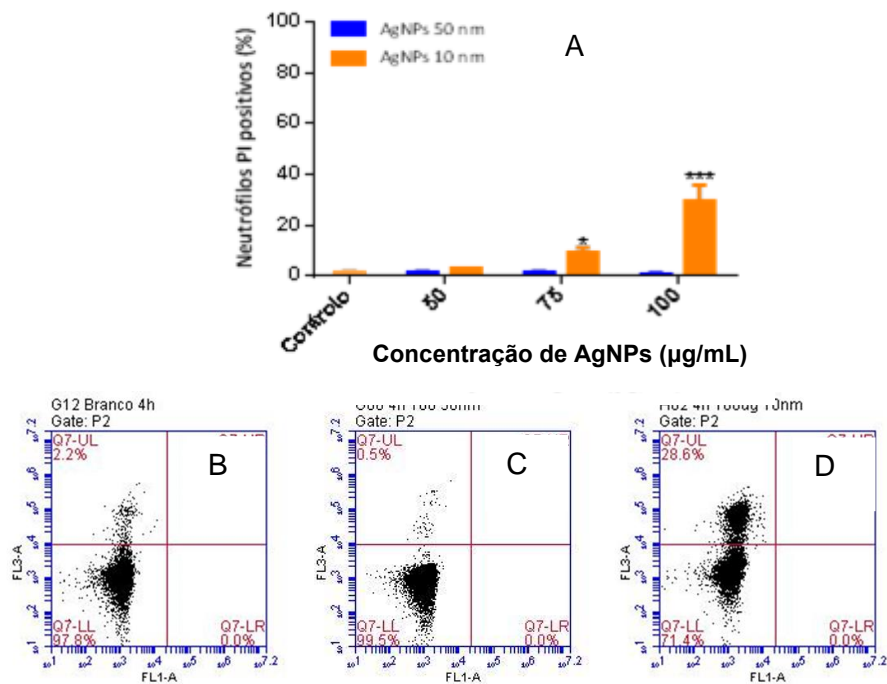
A avaliação da necrose pela quantificação da libertação de LDH não foi possível devido a uma interferência das AgNPs com a metodologia, impossibilitando a avaliação da necrose por este método.

#### 4.1.3 Método do PI

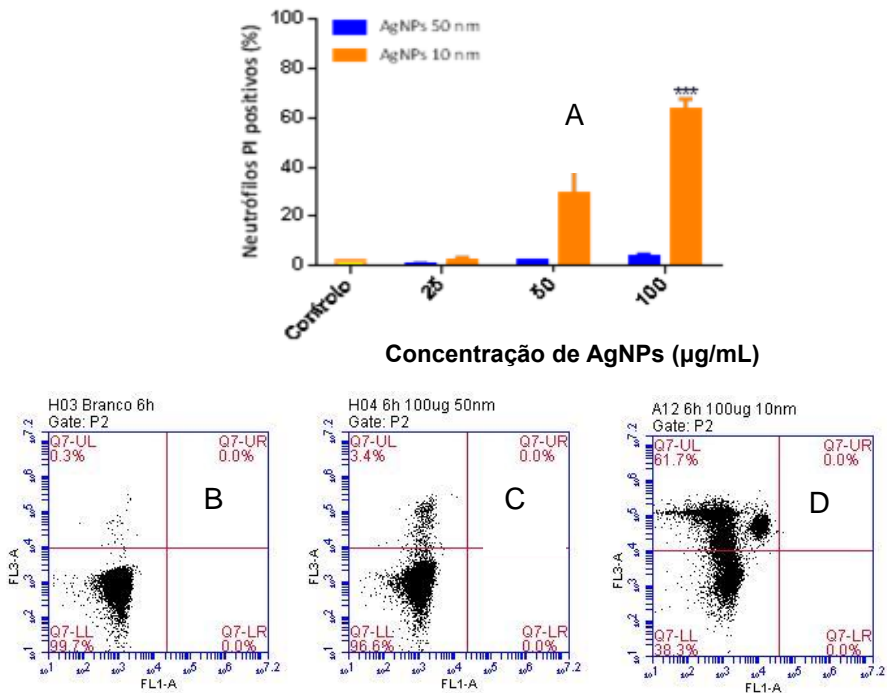
Nas **Figuras 28, 29 e 30** estão representados os resultados obtidos no estudo da determinação do PI incorporado pelos neutrófilos humanos após 4, 6 e 16h, respetivamente, de exposição a AgNPs de 10 e de 50 nm (0-100 µg/mL). Da análise da **Figura 28** verifica-se que, ao fim de 4h de incubação, as concentrações de 75 e 100 µg/mL das AgNPs de 10 nm induziram uma percentagem de células com PI incorporado de  $9 \pm 2\%$  e de  $30 \pm 6\%$ , respetivamente. Ao fim de 6h (**Figura 29**), as mesmas NPs originaram diferenças significativas relativamente ao controlo (sem NPs) a partir da concentração de 50 µg/mL. As AgNPs de 50 nm, com estes tempos de incubação (4 e 6h), não provocaram efeitos.

Da análise da **Figura 30**, verifica-se que, após 16h de incubação com as AgNPs de 10 nm, o aumento da percentagem de neutrófilos com PI incorporado é muito expressivo (na concentração de 12,5 µg/mL tem uma percentagem de PI incorporado de  $22 \pm 5\%$ ) e quando comparado com a exposição às AgNPs de 50 nm, em que, apesar de se verificar uma tendência de aumento dos níveis de PI, só se obtém significado estatístico para a concentração mais alta de 100 µg/mL ( $32 \pm 6\%$ ), sendo

mesmo assim, muito inferior quando comparada com as AgNPs de 10 nm na mesma concentração ( $77 \pm 10\%$ ).

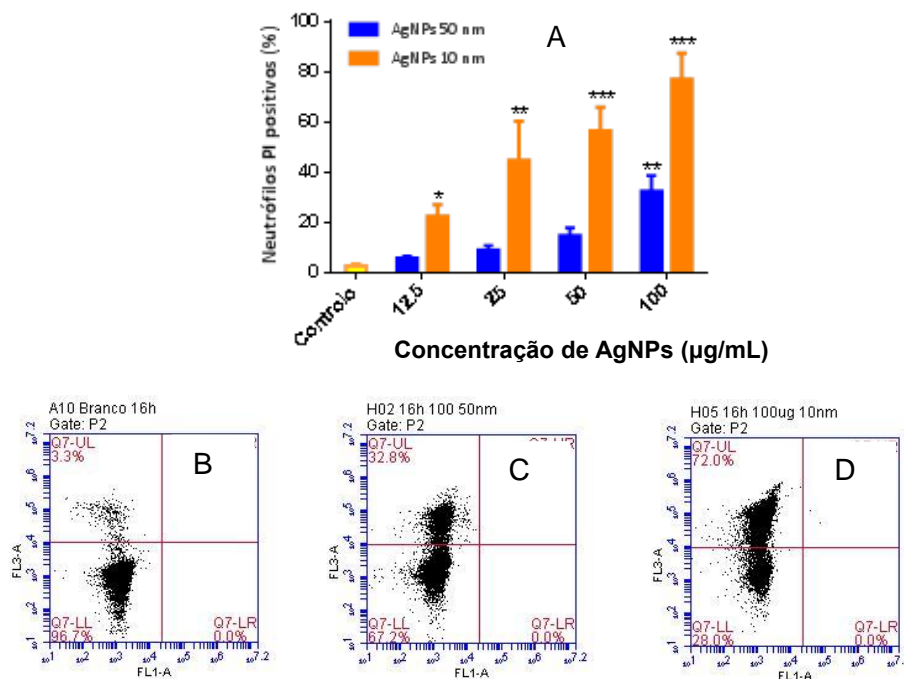


**Figura 28:** Avaliação da viabilidade celular de neutrófilos humanos expostos a AgNPs de 10 e 50 nm (0-100 µg/mL) pelo método do PI após incubação de 4h (A). Os valores são apresentados como a média  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ), \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , comparativamente ao controle (sem AgNPs). Imagens representativas da análise por citometria de fluxo dos neutrófilos PI positivos com 4h de incubação. Controle (B); AgNPs de 50 nm 100 µg/mL (C); AgNPs de 10 nm 100 µg/mL (D).





**Figura 29:** Avaliação da viabilidade celular de neutrófilos humanos expostos a AgNPs de 10 e 50 nm (0-100 µg/mL) pelo método do PI após incubação de 6h (A). Os valores são apresentados como a média ± SEM (n≥3), \*\*\*p<0,001, comparativamente ao controlo (sem AgNPs). Análise por citometria de fluxo dos neutrófilos PI positivos com 6h de incubação. Controlo (B); AgNPs de 50 nm 100 µg/mL (C); AgNPs de 10 nm 100 µg/mL (D).



**Figura 30:** Avaliação da viabilidade celular de neutrófilos humanos expostos a AgNPs de 10 e 50 nm (0-100 µg/mL) pelo método do PI após incubação de 16 h (A). Os valores são apresentados como a média ± SEM (n≥3), \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001, comparativamente ao controlo (sem AgNPs). Análise por citometria de fluxo dos neutrófilos PI positivos com 16h de incubação. Controlo (B); AgNPs de 50 nm 100 µg/mL (C); AgNPs de 10 nm 100 µg/mL (D).

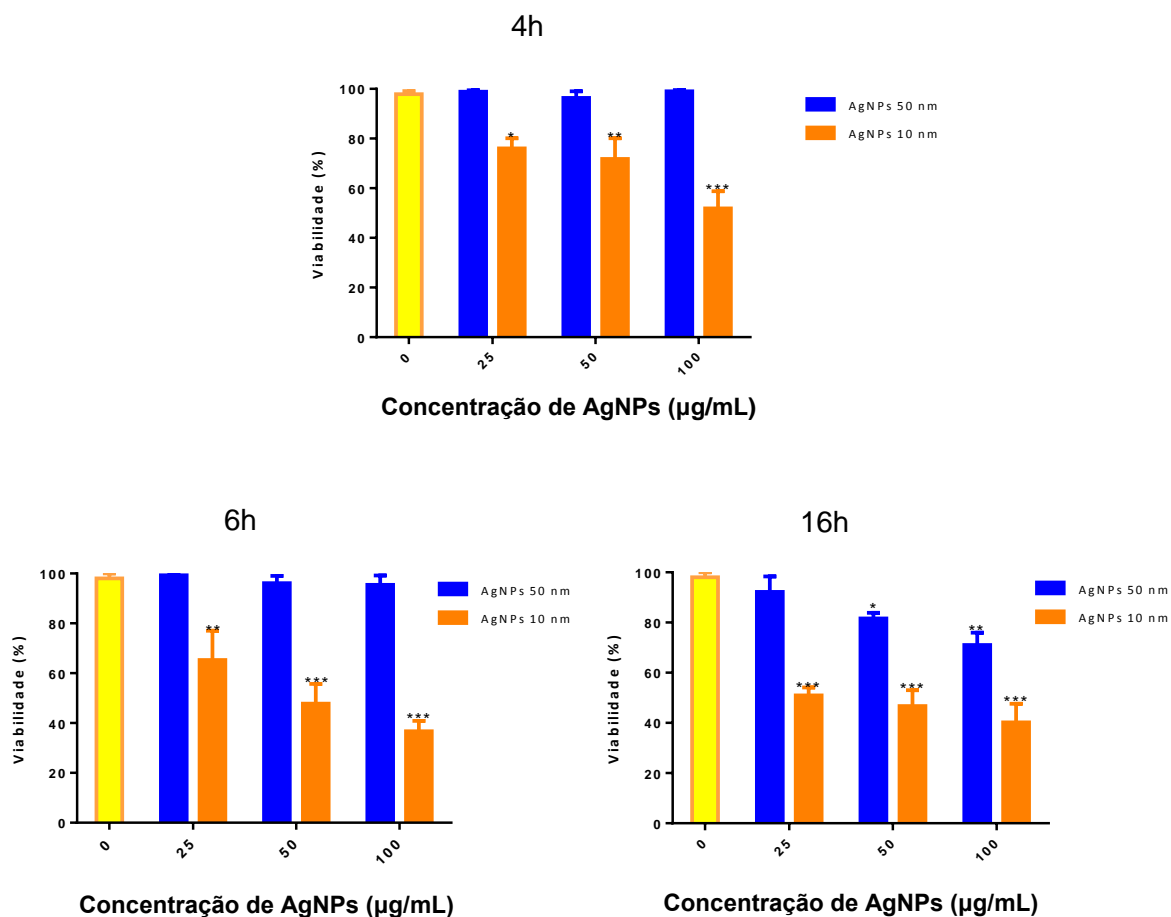
#### 4.1.4 Método do NR

A **Figura 31** representa os resultados obtidos no estudo da viabilidade celular dos neutrófilos, pelo ensaio da incorporação do NR, quando expostos durante 4, 6 e 16h, respetivamente, a AgNPs de 10 e de 50 nm (0-100 µg/mL).

Na **Figura 31-A**, correspondente ao gráfico das 4h de incubação, pode-se observar que, todas as concentrações de AgNPs de 10 nm, inclusivamente a mais baixa (25 µg/mL) revelaram sinais de citotoxicidade pela diminuição de sinal relativamente ao controlo. Inclusivamente, a concentração mais baixa de 25 µg/mL, apresenta uma percentagem de viabilidade de  $76 \pm 4\%$  já com significado estatístico quando

comparada com o controlo ( $98 \pm 2\%$ ). Por outro lado, com as AgNPs de 50 nm, não se verificam variações na viabilidade com nenhuma das concentrações. No gráfico **B**, verifica-se uma situação muito parecida em termos estatísticos, no entanto, a diminuição da viabilidade passadas apenas mais duas horas (6h) revela-se mais pronunciada. Verificam-se viabilidades de  $65 \pm 12$ ,  $48 \pm 8$  e  $37 \pm 4\%$ , para as concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , respetivamente. Em relação às AgNPs de 50 nm, para o mesmo tempo de incubação, não se verificam efeitos com significado estatístico, com uma percentagem de viabilidade de  $96 \pm 1\%$  para a concentração mais alta de 100  $\mu\text{g/mL}$  quando comparada com a do controlo ( $98 \pm 2\%$ ).

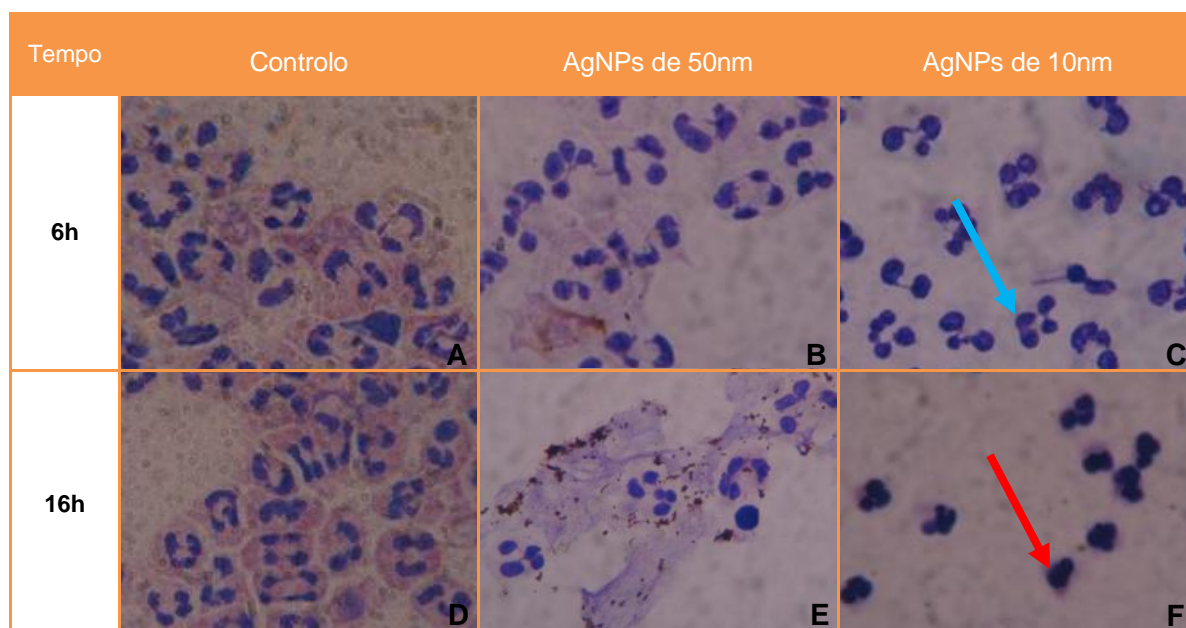
Com 16h de incubação com AgNPs de 10 nm, a percentagem de viabilidade não varia muito entre as concentrações, sendo de  $51 \pm 3$ ,  $47 \pm 6$  e  $40 \pm 7\%$  para as concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , respetivamente. Por outro lado, os neutrófilos expostos a AgNPs de 50 nm apresentaram uma percentagem de viabilidade celular de  $82 \pm 2\%$  na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ , sendo estatisticamente diferente quando comparada com o controlo. Sendo assim, verifica-se uma diminuição da viabilidade celular dependente da concentração, do tempo de incubação e do tamanho das NPs, segundo o método do NR.



**Figura 31:** Avaliação da viabilidade de neutrófilos humanos expostos a AgNPs de 10 e 50 nm (0-100 µg/mL) pelo método do NR após incubação de 4 (A), 6 (B) e 16h (C). Os valores são apresentados como a média  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , comparativamente com o controlo (sem AgNPs).

## 4.2 Análise morfológica por MOC

Na **Figura 32** estão representadas as imagens obtidas por microscopia ótica referentes a neutrófilos humanos expostos a AgNPs de 10 e de 50 nm, durante 6 e 16h. Realizou-se o mesmo estudo a tempos inferiores, contudo, nenhuma das AgNPs testadas (10 ou 50 nm) induziu alterações morfológicas diferentes do controlo. Pela análise da **Figura 32-C** verifica-se que ao fim de 6h de exposição às AgNPs de 10 nm, os neutrófilos apresentam uma ligeira contração das células e ligeira condensação dos neutrófilos (seta azul). Passadas 16h de exposição às mesmas NPs na mesma concentração, os neutrófilos apresentam-se contraídos, com núcleos sem a forma bilobada e condensados relativamente ao controlo (seta vermelha), apresentado assim as características típicas de apoptose que pode culminar em necrose secundária.

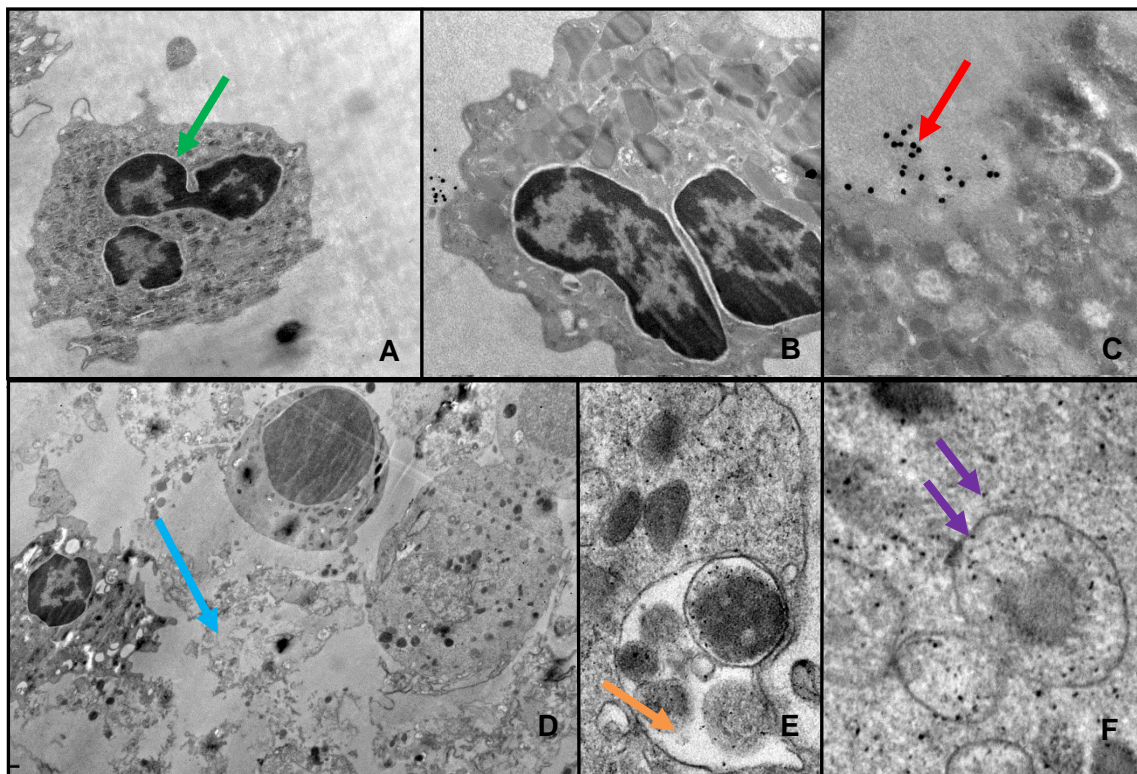


**Figura 32:** Morfologia de neutrófilos humanos quando expostos a AgNPs de 10 e 50 nm durante 6 e 16h (ampliação:1000 x).

## 4.3 Análise morfológica por TEM

As imagens por TEM foram obtidas após exposição dos neutrófilos às AgNPs de 10 e de 50 nm durante 16h. Na Figura 33 (A) temos representado o controlo às 16h, onde se podem observar as células íntegras com os seus característicos núcleos

multilobados (seta verde). As células expostas a AgNPs de 50 nm (100 µg/mL) (Figura 33 B) apresentam um aspeto muito semelhante ao controlo. Na **Figura 33-C**, pode-se observar AgNPs de 50 nm nas imediações dos neutrófilos. As dimensões destas partículas foram calculadas recorrendo às ferramentas da TEM e confirmou-se o tamanho descrito pelo fabricante, de 50 nm. Este resultado sugere que as AgNPs de 50 nm não passam para o interior das células. Na **Figura 33-D** pode-se observar os neutrófilos após 16h de exposição a AgNPs de 10 nm (100 µg/mL). Verifica-se que existe conteúdo citoplasmático libertado pelas células, disperso no campo. Os núcleos perderam os seus limites ou desapareceram completamente (seta azul). Na **Figura 33-E** pode-se observar um fagolisossoma (seta laranja) de um neutrófilo quando exposto à concentração de 100 µg/mL de AgNPs de 10 nm e na **Figura 33-F** pode-se verificar que nesse fagolisossoma, quando ampliado, se observam partículas (setas roxas) que, quando medidas recorrendo às ferramentas do TEM, correspondem às dimensões das AgNPs em questão (10 nm), sugerindo que estas AgNPs têm a capacidade de entrar nos neutrófilos humanos. A espectroscopia de raios X dispersiva de energia (EDS) também confirmou a natureza das NPs medidas como tendo na sua constituição maioritariamente Prata (91%) (**Tabela 4**).



**Figura 33:** Imagens por TEM de neutrófilos humanos expostos a AgNPs de 10 e 50 nm (100 µg/mL) durante 16h. A- Controlo (sem AgNPs) (ampliação 5000x). B- Com AgNPs de 50 nm. C- Prováveis AgNPs de 50 nm nas imediações exteriores de um neutrófilo (ampliação 40000x) (seta vermelha). D-

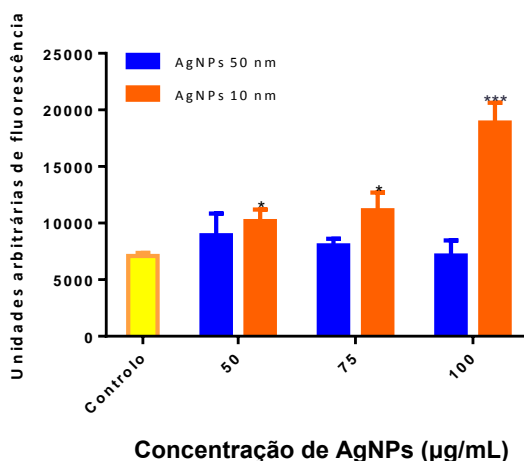
Com AgNPs de 10 nm (ampliação 8000x). E- Fagossoma (ampliação 40000x). F- Prováveis AgNPs de 10 nm no interior de um fagossoma (ampliação 200000x).

**Tabela 4:** Percentagens dos elementos identificados por EDS.

Elemento	Massa (%)
Fe	8.72
Ag	91.28
Total	100.00

#### 4.4 Efeito das AgNPs no *burst* oxidativo de neutrófilos humanos

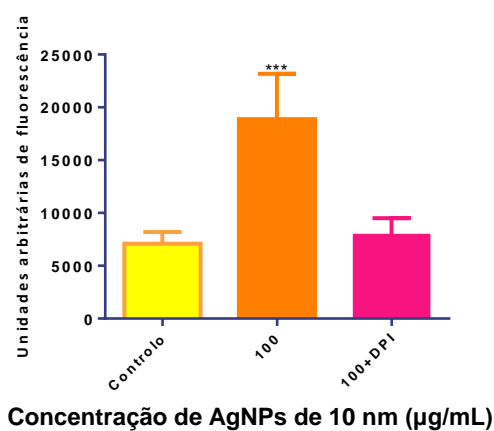
Na **Figura 34** estão representados os resultados obtidos no estudo da produção de espécies reativas pelos neutrófilos humanos quando expostos a AgNPs de 10 e 50 nm (0-100 µg/mL) durante 4h. Verificou-se que, das concentrações testadas, as AgNPs de 50 nm não foram capazes de induzir a produção de espécies reativas pelos neutrófilos. Pelo contrário, ficou claramente demonstrado que as AgNPs de 10 nm ativaram as células resultando na oxidação da sonda DHR. Essa ativação foi dependente da concentração, tendo-se verificado uma maior ativação para a concentração de 100 µg/mL.



**Figura 34:** Efeito das AgNPs de 10 e 50 nm (0-100 µg/mL) na produção de espécies reativas pelos neutrófilos humanos. A deteção foi feita após incubação de 4h, recorrendo à sonda DHR (10 µM) Os valores são apresentados como a média ± SEM (n≥3), \*p<0,05 e \*\*\*p<0,001, comparativamente ao controlo (sem AgNPs).

## 4.5 Contribuição da NADPH oxidase na ativação de neutrófilos humanos pelas AgNPs

Na **Figura 35** estão representados os resultados obtidos no estudo da contribuição da NADPH oxidase na ativação de neutrófilos humanos pelas AgNPs de 10nm. Pela análise do gráfico, verifica-se que o DPI (inibidor da NADPH oxidase) diminui o sinal induzido pelas AgNPs. Note-se que foi estudado o efeito do DPI, na viabilidade celular dos neutrófilos, e não se obteve qualquer alteração das células em contacto com o composto, como tal, a diminuição do sinal deveu-se à inativação da NADPH oxidase.



**Figura 35:** Efeito do DPI na ativação de neutrófilos humanos por AgNPs de 10 nm.. Os valores são apresentados como a média ± SEM (n≥3), \*\*\*p<0,001, comparativamente ao controlo (sem AgNPs).



## 5. Discussão

Com as metodologias utilizadas ficou claramente demonstrado que as AgNPs de 10 e 50 nm induzem toxicidade de neutrófilos humanos, sendo o efeito dependente do tamanho, tempo de exposição e concentração das NPs.

As AgNPs têm emergido como uma importante classe de nanomateriais com uma ampla gama de aplicações industriais e médicas, com grande relevância nos produtos de aplicação dérmica, nomeadamente no tratamento de queimaduras. Está descrito na literatura que as AgNPs são capazes de penetrar na pele (167, 168). Sendo assim, é importante saber qual o efeito destas NPs nas células que constituem a primeira linha de defesa do nosso organismo, os neutrófilos. Note-se que há pouca informação sobre o efeito das AgNPs nestas células, sendo por isso este trabalho de enorme relevância para o conhecimento sobre a toxicidade destas NPs. Outra contribuição importante deste trabalho diz respeito à utilização e comparação de vários métodos, rotineiramente utilizados em laboratório, para a avaliação da toxicidade das AgNPs em neutrófilos humanos.

As concentrações de AgNPs utilizadas neste estudo estão na gama utilizada por outros estudos *in vitro* (116, 127, 132). É importante mencionar que não há nenhum estudo que indique a concentração das AgNPs a que os humanos poderão estar expostos (89). No entanto, a investigação relativa aos efeitos citotóxicos das AgNPs é controversa, dado que existem estudos que revelam alta citotoxicidade em concentrações tão baixas quanto 2-5 µg/mL (126, 169, 170), como outros em que praticamente não se verifica toxicidade até à concentração de 100 µg/mL (131). As AgNPs induzem respostas diferentes dependendo do tipo de células em estudo (127, 171). Kaur e colaboradores observaram toxicidade das AgNPs em células epiteliais humanas de carcinoma A431, em células humanas de carcinoma pulmonar A549 e em macrófagos de murino RAW264.7, respetivamente, numa gama de concentrações de 5 a 100 µg/mL (171).

Neste trabalho, iniciou-se o estudo da viabilidade celular dos neutrófilos após exposição às AgNPs (10 e 50 nm) recorrendo ao método do azul tripano, que é um método já bastante descrito na literatura (154), inclusivamente, para avaliar a toxicidade destas e de outras NPs (172-174). Num estudo relativamente recente de Reddy e colaboradores foi avaliada a viabilidade de diferentes linhas celulares após exposição a NPs de carbono e foi utilizado apenas o método de exclusão do azul

tripano, por considerarem ser o mais isento de interferências quando se trata de NPs (173). No presente trabalho, com o método de incorporação do azul tripano, verificou-se que a viabilidade dos neutrófilos humanos foi dependente do tempo de exposição às AgNPs. Uma exposição de 6h não induziu efeitos, contudo, ao fim de 16h verificou-se uma redução estatisticamente significativa da viabilidade celular, que reduziu ainda mais às 24h com ambas as AgNPs. A viabilidade dos neutrófilos também reduziu com o aumento da concentração das AgNPs. Como exemplo, às 16 e 24h a concentração de 100 µg/mL provocou uma redução da viabilidade muito mais acentuada quando comparada com concentrações menores. Este método também revelou que a toxicidade das AgNPs depende do tamanho das mesmas. Ao fim de 16h de exposição, as AgNPs de 10 nm provocaram uma redução significativa da viabilidade (cerca de 50%) apenas com 12,5 µg/mL, comparativamente com as AgNPs de 50 nm que só demonstraram efeitos significativos, mas menos expressivos, com o quadruplo dessa concentração (50 µg/mL).

Num estudo com células epiteliais humanas dos brônquios BEAS 2B, realizado por Nymark e colaboradores, também foi verificada dependência do tempo (4 e 48h) e da concentração (2,5 a 240 µg/mL) com o método do azul tripano. No entanto, neste estudo verificou-se redução da viabilidade na concentração mais baixa às 4h (174), enquanto no presente estudo só foi verificada toxicidade com 16h de exposição com concentrações superiores a 12,5 µg/mL. Esta diferença pode ser justificada pela utilização de dois tipos de células diferentes. A variação de tamanho das NPs não parece justificar esta diferença dado que, no estudo de Nymark tratou-se de AgNPs revestidas com PVP com  $42,5 \pm 14,5$  nm de diâmetro, o que está dentro da gama de tamanho do presente estudo (10 e 50 nm).

Por outro lado, um estudo realizado igualmente com neutrófilos (89) indica que, para todas as condições testadas (0 a 100 µg/mL) durante 24h não se verificou diminuição da viabilidade com o método do azul tripano com AgNPs de 20 nm não revestidas. O não revestimento com PVP poderá estar na origem da aglomeração das NPs, não permitindo a sua entrada na célula e com a consequente diminuição da toxicidade. Este é um exemplo, que vem de encontro ao já referido anteriormente (secção 2.2.1), de que os revestimentos das NPs são importantes pelo facto de poderem alterar os seus efeitos.

O método do PI é semelhante ao azul tripano pois, pela aplicação do PI é possível contar por citometria de fluxo células com a integridade membranar comprometida, sendo indicador de células em necrose (154). Com o método do PI verificou-se que ao fim de 4h, com as concentrações mais altas de 75 e 100 µg/mL de AgNPs de 10 nm



houve um aumento da percentagem de células com PI incorporado relativamente ao controlo. Ao fim de 6h, as mesmas NPs originaram diferenças significativas relativamente ao controlo a partir da concentração de 50 µg/mL. As AgNPs de 50 nm, com estes tempos de incubação (4 e 6h), não provocaram efeitos. Após 16h de incubação com as AgNPs de 10 nm, o aumento da percentagem de neutrófilos com PI incorporado foi muito expressivo e quando comparado com a exposição às AgNPs de 50 nm, em que, apesar de se verificar uma tendência de aumento dos níveis de PI, só se obteve significado estatístico para a concentração mais alta de 100 µg/mL ( $32 \pm 6\%$ ), sendo mesmo assim, muito inferior quando comparada com as AgNPs de 10 nm na mesma concentração ( $77 \pm 10\%$ ).

Apesar da semelhança de mecanismo com o azul tripano, o PI revelou resultados mais rápidos e com concentrações menores. As diferenças encontradas entre o método do azul tripano e o do PI podem ser devidas à diferença de massa destas moléculas. O azul tripano tem uma massa de 960 Dalton (176), enquanto o PI tem 668 Dalton (177). Esta diferença de tamanho pode ser suficiente para o PI ser interiorizado mais depressa em caso de perda da integridade da membrana. Outro fator importante é o facto de no método do azul tripano se fazer a contagem ao microscópio ótico e no PI se utilizar a citometria de fluxo, uma metodologia mais sensível e pouco subjetiva. Apesar do azul tripano se tratar de um método rápido, útil e barato ( $\pm 0,01$  € por amostra), não é suficientemente sensível ou fiável para ser usado, pelo menos como método único, em ensaios de toxicidade *in vitro*. Outra desvantagem deste método diz respeito ao tempo de execução, que não permite o estudo da viabilidade de muitas amostras ao mesmo tempo, principalmente devido à exigência de a contagem manual das células, não deixando de ser subjetiva (154). O método do PI, para além de nos indicar a diminuição da viabilidade dependente do tempo e da concentração das AgNPs, principalmente com as de 10 nm, indica que a causa de morte celular foi necrótica. A maior parte dos estudos já realizados com outras linhas celulares indicam morte celular por apoptose (114, 120, 122), inclusive um estudo que foi realizado com AgNPs de 20 nm também em neutrófilos humanos (89). No entanto, a causa de morte celular necrótica também foi verificada em outras células imunitárias nomeadamente em linfócitos com AgNPs  $\leq 100$  nm com o método do PI, ao fim de 3h de exposição, com a concentração de 25 µg/mL. No estudo de Kim e colaboradores foi avaliada a toxicidade de AgNPs de diferentes tamanhos em duas linhas celulares diferentes. Numa linha celular, MC3T3-E1, a causa principal de morte celular foi a apoptose, enquanto na linha celular PC12 foi a necrose (127).

Com o método do NR, a partir das 4h de exposição, todas as concentrações de AgNPs de 10 nm, inclusivamente a mais baixa testada (25 µg/mL) revelaram sinais de citotoxicidade pela diminuição de sinal relativamente ao controlo. Por outro lado, as AgNPs de 50 nm, com o menor tempo de exposição testado, não induziram variações na viabilidade com nenhuma das concentrações. Só foi verificada alteração na viabilidade celular dos neutrófilos expostos às AgNPs de 50 nm com 16h de exposição, em que apresentaram uma percentagem de viabilidade celular de  $82 \pm 2\%$  na concentração de 50 µg/mL, sendo estatisticamente diferente quando comparada com o controlo.

Este resultado está de acordo com um estudo de Grosse e colaboradores que, com AgNPs de 10 e 50 nm verificaram toxicidade em células endoteliais de cérebro de rato. No entanto, com o mesmo tempo de exposição obtiveram citotoxicidade com o método do NR com uma concentração menor de AgNPs de 10 nm (10 µg/mL com 4h) (124). Estas diferenças podem estar relacionadas com o facto de se tratarem de linhas celulares distintas. Liu e colaboradores documentaram que AgNPs de 5 nm eram mais tóxicas em comparação com as partículas de 20 e 50 nm, respetivamente, em quatro linhas celulares diferentes (178). Estes resultados corroboram os obtidos no presente trabalho, em que as AgNPs de 10 nm se revelaram mais citotóxicas do que as de 50 nm em todos os métodos utilizados.

Com o ensaio do NR verificou-se toxicidade com uma concentração inferior de AgNPs de 10 nm (25 µg/mL) relativamente ao ensaio do PI que só revelou toxicidade com as mesmas AgNPs com mesmo tempo de incubação com uma concentração 3 vezes superior.

No que respeita às AgNPs de 50 nm também se verificaram diferenças entre os métodos. No ensaio do NR notaram-se diferenças significativas entre o controlo e as células tratadas, a partir da concentração de 50 µg/mL. Com o método do PI só se observaram diferenças na concentração mais alta, de 100 µg/mL. No entanto, esta diferença na concentração mais alta é mais acentuada para o método do PI do que para o método do vermelho neutro, verificando-se que, para este último, o valor da viabilidade às 16h foi muito próximo para as 3 concentrações estudadas indicando assim que o seu efeito máximo é menor e menos sensível às concentrações mais altas quando comparado com o método do PI.

O NR é um corante catiónico fraco e supõe-se que a entrada do corante no citosol é mediada por difusão não iónica através da membrana celular. Dentro da célula, o corante acumula-se nos lisossomas de células viáveis, mas não em células com danos ou mortas, como já foi referenciado. Segundo Grosse e colaboradores, as AgNPs

parecem prejudicar a função da membrana, pois são capazes de reduzir a difusão não aniônica e reter o corante nos lisossomas sem haver disrupção da membrana (124). Isto pode justificar o facto do método do NR ter fornecido respostas mais rápidas e com menor concentração do que o do PI e o azul tripano.

Apesar do método do PI ser mais fácil de executar e apresentar maior sensibilidade, é muito caro (3,40 € de PI por 10 amostras), o que faz com que a escolha para a avaliar a viabilidade recaia sobre ensaio do NR que forneceu efeitos com concentrações mais reduzidas, sendo muito mais barato (0,07 € de NR por 10 amostras). No entanto, este método é mais trabalhoso e moroso. Contudo, e para evitar conclusões erróneas é sempre aconselhada a utilização de outro método.

Este trabalho, para além do estudo da toxicidade das AgNPs em neutrófilos humanos, permitiu a implementação e comparação de vários métodos para determinação da viabilidade celular. Os resultados obtidos revelaram diferenças relevantes entre os métodos no que diz respeito à sensibilidade de cada um deles, tempo de execução e custo. O método do PI e o do NR demonstraram ser mais sensíveis ao tempo de exposição, quando comparados com o método do azul tripano, mostrando diferenças significativas entre os controlos e as células tratadas e com incubações mais curtas. As diferenças encontradas nos métodos utilizados podem ser explicadas pelas características intrínsecas de cada método tal como já foi discutido.

Note-se que neste trabalho também foi utilizado o método da LDH que mede a libertação de LDH intracelular para o meio de cultura sendo um indicador de morte celular irreversível devido a danos na membrana da célula (158). Contudo, as NPs em estudo interferiram com o método e como tal não foi possível tirar conclusões com este ensaio. Este tipo de interferência já tinha sido descrito na literatura (179-181). Oh e colaboradores estudaram o mecanismo desta interferência utilizando dois tipos de AgNPs (com e sem citrato) em que ambas interferiram com o resultado. Os autores sugeriram que as AgNPs adsorviam a LDH, e que as AgNPs juntamente com a LDH poderiam ser removidas da amostra a analisar durante a preparação das amostras com uma libertação de LDH das células subestimada. Também sugerem que a libertação de ROS pelas AgNPs também diminui esta expressão além da adsorção de outras proteínas (180). Este mecanismo continua sem estar totalmente esclarecido, já que existem estudos em que o ensaio da LDH continua a ser aplicado, supostamente sem problemas (89, 127, 182). Existem outros ensaios que poderão sofrer interferências com as AgNPs como o ensaio do MTT (131) e MTS (183) pelas suas fortes interferências óticas. Este facto reforça a ideia de que a escolha do método para

avaliação da viabilidade deve ser criteriosa e idealmente deve-se utilizar mais do que um método.

Pela análise das células por TEM, verificou-se claramente que as AgNPs de 10 nm têm capacidade de entrar na célula, encontrando-se em vesículas e no citosol, estando este resultado de acordo com o estudo de Poirier e colaboradores que utilizaram AgNPs de 20 nm (89). Asharani e colaboradores sugerem que as AgNPs com diâmetros entre 6 e 20 nm penetram nas células e adsorvem as proteínas citosólicas, o que limita a capacidade das células na manutenção das suas funções (111). Kim e Choi após estudo com macrófagos humanos e AgNPs de 5 nm revestidas com PVP sugerem que além de entrarem por endocitose e fagocitose, as AgNPs de pequenas dimensões poderão entrar por outros meios diretamente através da membrana (184). De referir, que no presente trabalho, utilizando a citometria de fluxo não se verificaram alterações proporcionais no que respeita ao volume e complexidade celular (dados não apresentados) como verificado por Poirier e colaboradores com AgNPs de 20 nm na concentração de 100 µg/mL (89). No entanto, os autores mencionados confirmaram por DLS, a presença de grandes agregados de AgNPs. Com a utilização de TEM, não foi possível identificar agregados de AgNPs, que pelo contrário se encontravam bem individualizadas. A PVP pode ser a responsável por esta conservação de individualidade destas NPs, já com NPs não revestidas, como as usadas por Poirier e colaboradores, a probabilidade de agregação é maior (89). A agregação faz com que as NPs sejam menos reativas ficando com uma menor área de superfície reativa. Este facto foi confirmado por Grosse e colaboradores que utilizaram o ICP-MS e demonstraram que as partículas maiores ou mais aglomeradas apresentavam uma libertação de iões  $\text{Ag}^+$  reduzida comparada com AgNPs menores (124), o que pode justificar o facto de, neste trabalho, as AgNPs de 10 nm serem mais tóxicas do que as de 50 nm.

Ao contrário do que foi visualizado com as AgNPs de 10 nm, as de 50 nm não se encontravam no interior das células. Num estudo de Nymark e colaboradores, a concentração de 100 µg/mL de dois tipos de AgNPs, com tamanhos compreendidos entre 30 e 50 nm, que diferiam no tipo de síntese (diferentes agentes redutores), foi testada em células A431 epiteliais cancerígenas da pele. Os autores verificaram que um dos tipos de AgNPs entraram nas células e espalharam-se pelo citoplasma e núcleo, enquanto outras AgNPs ficaram nas imediações da célula formando agregados, ficando assim maiores e tendo maior dificuldade em transpor a membrana celular (174). No presente estudo, como já referido não foram observados agregados, no entanto, é importante ter em conta que o tipo de síntese pode alterar as

características intrínsecas das AgNPs, podendo assim, originar os diferentes resultados que se encontram descritos na literatura (166).

Em relação à análise morfológica, só foram verificadas alterações a partir das 6h com as AgNPs de 10 nm. Ao fim desse tempo, as células apresentavam uma ligeira contração e ligeira condensação dos núcleos. Ao fim de 16h, observou-se que os neutrófilos quando expostos às AgNPs de 10 nm se apresentavam bastante contraídos e os seus núcleos tinham perdido a forma bilobada. Apresentam assim características típicas de apoptose que pode culminar em necrose secundária. Relativamente à exposição às AgNPs de 50 nm, notou-se apenas uma ligeira diferença relativamente ao controlo sem que fosse possível tirar nenhuma informação concreta, devido à subjetividade deste tipo de análise associado ao facto de ser um método apenas qualitativo.

Está descrito na literatura que um dos mecanismos pelos quais as AgNPs induzem toxicidade passa pela produção de espécies reactivas (118, 119, 126). Os neutrófilos defendem o nosso organismo através da produção de espécies reactivas. Quando essa produção é excessiva, ultrapassando inclusivamente, a capacidade dos antioxidantes em neutralizar essas espécies, as células entram no chamado stresse oxidativo, que culmina em danos para o hospedeiro (185).

Tendo em conta que não está descrito na literatura o efeito destas NPs na produção de espécies reativas pelos neutrófilos humanos, foi objetivo deste trabalho contribuir para a elucidação desse efeito.

Para a deteção das espécies reactivas recorreu-se à sonda DHR, que não sendo específica, deteta várias espécies reactivas como o  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  e o  $ONOO^-$ . Ficou demonstrado que as AgNPs de 10 nm têm capacidade de induzir a produção de espécies reativas de uma forma dependente da concentração. Já com as AgNPs de 50 nm, nas presentes condições experimentais, não foi possível detetar a produção de espécies reativas. A produção de espécies reativas pelos neutrófilos inicia-se com a ativação da enzima NADPH oxidase. Trata-se de um complexo enzimático composto por várias subunidades, algumas presentes no citoplasma, outras na membrana plasmática. Após estimulação das células, ocorre a união de todos os componentes tornando a enzima ativa e capaz de produzir  $O_2^{\bullet-}$  (40). A partir do  $O_2^{\bullet-}$  formam-se, em cascata, as outras espécies reativas nomeadamente  $H_2O_2$ , o HOCl, o  $HO\bullet$  e o  $^1O_2$  e RNS, em particular o  $\bullet NO$  e o  $ONOO^-$ . Para confirmar que a ativação dos neutrófilos pelas AgNPs ocorre via ativação da NADPH oxidase, utilizou-se um inibidor da enzima, o DPI. O DPI inibiu o sinal, comprovando o envolvimento da NADPH oxidase na ativação das células pelas AgNPs.

A influência do tamanho das AgNPs na produção de espécies reativas também foi verificada em macrófagos de rato após 24h de tratamento com AgNPs de 15, 30 e 55 nm, em que a produção mais pronunciada de ROS ocorreu com as AgNPs de 15 nm (118), corroborando os resultados aqui apresentados.

As espécies reativas podem originar alterações na função mitocondrial (114, 125, 126, 130), que podem induzir a morte celular por necrose devido à depleção de ATP ou à apoptose mediada pelas caspases. O processo de apoptose é desencadeado se a permeabilidade da membrana mitocondrial se alterar apenas numa subpopulação de mitocôndrias e as restantes forem ainda capazes de manter o potencial de membrana e produzir ATP suficiente para suportar o processo (186). Assim, pode-se supor que os danos celulares provocados nas presentes condições experimentais pelas AgNPs foram bastante abrangentes para resultarem em morte celular apoptótica. Talvez se deva ao facto dos neutrófilos terem poucas mitocôndrias comparativamente com outras células. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que, a produção de espécies reativas pelos neutrófilos expostos a AgNPs pode ser um mecanismo pelo qual as AgNPs induzem a toxicidade nestas células.

Com os resultados obtidos neste trabalho, ficou claramente demonstrado que as AgNPs revestidas com PVP são citotóxicas para os neutrófilos humanos. Sendo que, o nível de toxicidade varia com o tamanho, tempo de exposição e concentração das AgNPs. Independentemente do método utilizado neste estudo, a comparação dos tamanhos das AgNPs revelou sempre uma resposta mais pronunciada por parte das AgNPs de menor diâmetro (10 nm) relativamente às de 50 nm. Este efeito pode estar relacionado com o facto das AgNPs de 10 nm serem capazes de entrar nas células como se verificou por TEM associado ao facto de serem capazes de induzir a produção de espécies reactivas em neutrófilos humanos.

## 6.Referências bibliográficas

1. Seeley R. Stephens T. Tate P. Leal M. Durão M. Abecasis L. Anatomia e fisiologia. 6ª ed. Loures: Lusociência; 2003.
2. Guyton A. Hall J. Martins B. Tratado de fisiologia médica. 11.ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.
3. Moore G. Blann A. Knight G. Haematology. 1<sup>st</sup> ed. Oxford: Oxford University Press; 2010.
4. Silverthorn D. Human physiology : an integrated approach. 5<sup>th</sup> ed. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings; 2010.
5. McNicol A. Israels S. Beyond hemostasis: the role of platelets in inflammation, malignancy and infection. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets 2008;8(2):99-117.
6. Gresele P. Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders : pathophysiology, pharmacology and therapeutics. 1<sup>st</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2002.
7. Tijssen M. Ghevaert C. Transcription factors in late megakaryopoiesis and related platelet disorders. J Thromb Haemost 2013;11(4):593-604.
8. Ko B. Gim J. Nam J. Cell image classification based on ensemble features and random forest. Electron Lett 2011;47(11):638-639.
9. Rosenberg H. Dyer K. Foster P. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. Nat Rev Immunol 2013;13(1):9-22.
10. Fulkerson P. Rothenberg M. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. Nat Rev Drug Discov 2013;12(2):117-129.
11. Karasuyama H. Obata K. Wada T. Tsujimura Y. Mukai K. Newly appreciated roles for basophils in allergy and protective immunity. Allergy 2011;66(9):1133-1141.
12. Siracusa M. Perrigoue J. Comeau M. Artis D. New paradigms in basophil development, regulation and function. Immunol Cell Biol 2010;88(3):275-284.
13. Amulic B. Cazalet C. Hayes G. Metzler K. Zychlinsky A. Neutrophil function: From mechanisms to disease. Annu Rev Immunol 2012;30(2):459-489.
14. Martineau A. Newton S. Wilkinson K. Kampmann B. Wilkinson R. Hall B. *et al.* Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. J Clin Invest 2007;117(7):1988-1994.
15. Saitoh T. Komano J. Saitoh Y. Misawa T. Takahama M. Kozaki T. *et al.* Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. Cell Host Microbe 2012;12(1):109-116.

- 16.Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med* 2013;210(7):1283-1299.
- 17.Katragkou A. Chatzimoschou A. Simitsopoulou M. Georgiadou E. Roilides E. Additive antifungal activity of anidulafungin and human neutrophils against *Candida parapsilosis* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2011;66(3):588-591.
- 18.Kolaczowska E. Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013;13(3):159-175.
- 19.Majno G. Joris I. Cells, tissues, and disease : principles of general pathology. 1<sup>st</sup> ed. New York: Oxford University Press; 2004.
- 20.Gunzer M. Traps and hyper inflammation – new ways that neutrophils promote or hinder survival. *Br J Haematol* 2014;164(2):189-199.
- 21.DeFranco J. Neutrophils : lifespan, functions and roles in disease. 1<sup>st</sup> ed. New York: Nova Science; 2010.
- 22.Mayadas T. Cullere X. Lowell C. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol* 2014;9(1):181-218.
- 23.Gabrilovich D. The Neutrophils : new outlook for old cells. 3<sup>rd</sup> ed. London: Imperial College Press; 2013.
- 24.Poon I. Hulett M. Parish C. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death Differ* 2009;17(3):381-397.
- 25.Kennedy A. DeLeo F. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res* 2009;43(1-3):25-61.
- 26.El Kebir D. Filep J. Role of neutrophil apoptosis in the resolution of inflammation. *TheScientificWorldJournal* 2010;1(10).1731-1748.
- 27.Lahorte C. Vanderheyden J. Steinmetz N. van de Wiele C. Dierckx R. Slegers G. Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31(6):887-919.
- 28.Chowdhury I. Bhat G. Tharakan B. Caspases - an update. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochem Mol Med* 2008;151(1):10-27.
- 29.Geering B. Stoeckle C. Conus S. Simon H. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends Immunol* 2013;34(8):398-409.
- 30.Golstein P. Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 2007(1):37-43.
- 31.McCall K. Genetic control of necrosis -- another type of programmed cell death. *Curr Opin Chem Biol* 2010(6):882-888.
- 32.Iba T. Hashiguchi N. Nagaoka I. Tabe Y. Murai M. Neutrophil cell death in response to infection and its relation to coagulation. *J. Intensive Care Med* 2013;1(1):1-10.



- 33.Theilgaard-Mönch K. Porse B. Borregaard N. Systems biology of neutrophil differentiation and immune response. *Curr Opin Immunol* 2006;18(1):54-60.
- 34.Lee H. Na H. Surh Y. Resolution of inflammation as a novel chemopreventive strategy. *Semin Immunopathol* 2013;35(2):151-161.
- 35.Mayer-Scholl A. Averhoff P. Zychlinsky A. How do neutrophils and pathogens interact? *Curr Opin Microbiol* 2004;7(1):62-66.
- 36.Fialkow L. Wang Y. Downey G. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med* 2007;42(2):153-64.
- 37.Flannagan R. Cosio G. Grinstein S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Micro* 2009;7(5):355-366.
- 38.Pourova J. Kottova M. Voprsalova M. Pour M. Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. *Acta Physiol (Oxf)* 2010;198(1):15-35.
- 39.Giustarini D. Dalle-Donne I. Tsikas D. Rossi R. Oxidative stress and human diseases: origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2009;46(5-6):241-281.
- 40.Bartosz G. Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments Toxicol* 2003;9(1):5-21.
- 41.Holland S. Chronic granulomatous disease. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2010;38(1):3-10.
- 42.Freitas M. Lima JLFC. Fernandes E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. *Anal Chim Acta* 2009;649(1):8-23.
- 43.Pruchniak M. Arazna M. Demkow U. Review: Life of neutrophil: from stem cell to neutrophil extracellular trap. *Respir Physiol Neurobiol* 2013;187(1):68-73.
- 44.Suh W. Suslick K. Stucky G. Suh Y. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Prog Neurobiol* 2009;87(3):133-170.
- 45.Maqusood A. Mohamad S. Siddiqui M. Invited critical review: silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta* 2010;411(11):1841-1848.
- 46.Chaudhuri R. Paria S. Core/shell nanoparticles: classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications. *Chem Rev* 2012;112(4):2373-2433.
- 47.Galdiero S. Falanga A. Vitiello M. Cantisani M. Marra V. Galdiero M. Silver nanoparticles as potential antiviral agents. *Molecules* 2011;16(10):8894-8918.
- 48.Allahverdiyev A. Abamor E. Bagirova M. Rafailovich M. Antimicrobial effects of TiO<sub>2</sub> and Ag<sub>2</sub>O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmania parasites. *Future Microbiol* 2011;6(8):933-940.
- 49.Wiesenthal A. Hunter L. Wang S. Wickliffe J. Wilkerson M. Nanoparticles: small and mighty. *Int J Dermatol* 2011;50(3):247-254.

- 50.You C. Han C. Wang X. Zheng Y. Li Q. Hu X. *et al.* The progress of silver nanoparticles in the antibacterial mechanism, clinical application and cytotoxicity. *Mol Biol Rep* 2012;39(9):9193-9201.
- 51.Huang Z. Jiang X. Guo D. Gu N. Controllable synthesis and biomedical applications of silver nanomaterials. *J Nanosci Nanotechnol* 2011;11(11):9395-9408.
- 52.Gangwal S. Brown J. Wang A. Houck K. Dix D. Kavlock R. *et al.* Informing selection of nanomaterial concentrations for toxcast *in vitro* testing based on occupational exposure potential. *Environ Health Perspect* 2011;119(11):1539-1546.
- 53.Fabrega J. Luoma S. Tyler C. Galloway T. Lead J. Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environ Int* 2011;37(2):517-531.
- 54.Chen X. Schluesener H. Nanosilver: A nanoprodut in medical application. *Toxicol Lett* 2008;176(1):1-12.
- 55.Arviso R. Bhattacharyya S. Kudgus R. Giri K. Bhattacharya R. Mukherjee P. Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future. *Chem Soc Rev* 2012;41(7):2943-2970.
- 56.Radetić M. Functionalization of textile materials with silver nanoparticles. *J Mater Sci* 2012:1-13.
- 57.Merchant F. Carpenter T. Blue-gray discoloration of the skin. *Am Fam Phys* 2011;84(7):821-822.
- 58.Hahn H. Unique features and properties of nanostructured materials. *Adv Eng Mater* 2003;5(5):277-284.
- 59.Panáček A. Kvítek L. Prucek R. Kolář M. Večeřová R. Pizúrová N. *et al.* Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem B* 2006;110(33):16248-16253.
- 60.Marambio-Jones C. Hoek EMV. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment *J Nanopart Res* 2010;12(5):1531-1551.
- 61.Chaloupka K. Malam Y. Seifalian A. Review: nanosilver as a new generation of nanoprodut in biomedical applications. *Trends Biotechnol* 2011;28(11):580-588.
- 62.Ghorbani H. Safekordi A. Attar H. Sorkhabadi S. Biological and non-biological methods for silver nanoparticles synthesis. *Chem Biochem Eng Q* 2011;25(3):317-326.
- 63.Ravindran A. Chandran P. Khan S. Biofunctionalized silver nanoparticles: advances and prospects. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010; 105(1):342-352.
- 64.Nair L. Laurencin C. Silver nanoparticles: synthesis and therapeutic applications *J. Biomed Nanotechnol* 2007; 3(4):301-316.

- 65.Salata O. Applications of nanoparticles in biology and medicine. J Nanobiotechnology 2004;2(1):3-6.
- 66.Sperling R. Parak W. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. Phil Trans R Soc A 2010;368(1915):1333-1383.
- 67.Abou El-Nour K. Eftaiha A. Al-Warthan A. Ammar R. Synthesis and applications of silver nanoparticles. Arabian J Chem 2010;3(3):135-140.
- 68.Liu J. Yu S. Yin Y. Chao J. Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles. Trends Anal. Chem 2012;33(0):95-106.
- 69.Amrithkar A. Chaudhari H. Narkhede D. Jain D. Baviskar D. Nanotechnology for biomedical application. Int J Pharm Pharm Sci 2011;8(2):45-53.
- 70.Percival S. Bowler P. Dolman J. Antimicrobial activity of silver-containing dressings on wound microorganisms using an *in vitro* biofilm model. Int Wound J 2007;4(2):186-191.
- 71.Wijnhoven SWP. Peijnenburg W. Herberts C. Hagens W. Oomen A. Heugens E. *et al.* Nano-silver - a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. Nanotoxicology 2009;3(2):109-138.
- 72.Pinto R. Almeida A. Fernandes S. Freire C. Silvestre A. Neto C. *et al.* Antifungal activity of transparent nanocomposite thin films of pullulan and silver against *Aspergillus niger*. Colloids Surf B Biointerfaces 2013;103(1):143-148.
- 73.Hwang I. Lee J. Hwang J. Kim K. Lee D. Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. FEBS J 2012;279(7):1327-1338.
- 74.Roy S. Mukherjee T. Chakraborty S. Das T. Biosynthesis, characterization & antifungal activity of silver nanoparticles synthesized by the fungus *Aspergillus foetudus* MTCC8876. Dig J Nanomater Bios 2013;8(1):197-205.
- 75.Kim J. Kuk E. Yu K. Kim J-H. Park S. Lee H. *et al.* Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine 2007;3(1):95-101.
- 76.Sang K. Jin J. Kabir L. Yun K. Ji M. Youn L. Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic Fungi. Mycobiology 2012;40(1):53-58.
- 77.Kim K. Sung W. Suh B. Moon S. Choi J. Kim J. *et al.* Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*.(Report). BioMetals. 2009(2):235-242.
- 78.Elechiguerra J. Burt J. Morones J. Camacho-Bragado A. Xiaoxia G. Lara H. *et al.* Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. J Nanobiotechnology 2005;3(1):6-10.

- 79.Trefry J. Wooley D. Rapid assessment of antiviral activity and cytotoxicity of silver nanoparticles using a novel application of the tetrazolium-based colorimetric assay. *J Virol Methods* 2012;183(1):19-24.
- 80.Xiang D. Chen Q. Pang L. Zheng C. Inhibitory effects of silver nanoparticles on H1N1 influenza A virus *in vitro*. *J Virol Methods* 2011;178(1–2):137-142.
- 81.Lu L. Sun R. Chen R. Hui C. Ho C. Luk J. *et al*. Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antivir Ther* 2008;13(2):253-262.
- 82.Fayaz M. Ao Z. Girilal M. Chen L. Xiao X. Kalaichelvan P. *et al*. Inactivation of microbial infectiousness by silver nanoparticles-coated condom: a new approach to inhibit HIV- and HSV-transmitted infection. *Int J Nanomedicine* 2012;7(1):5007-5018.
- 83.Tian J. Wong K. Ho C. Lok C. Yu W. Che C. *et al*. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem* 2007;2(1):129-136.
- 84.Bhol K. Schechter P. Topical nanocrystalline silver cream suppresses inflammatory cytokines and induces apoptosis of inflammatory cells in a murine model of allergic contact dermatitis. *Br J Dermatol* 2005;152(6):1235-1242.
- 85.Nadworny P. Wang J. Tredget E. Burrell R. Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model. *Nanomedicine* 2008;4(3):241-251.
- 86.Wong K. Cheung S. Huang L. Niu J. Tao C. Ho C. *et al*. Further evidence of the anti-inflammatory effects of silver nanoparticles. *ChemMedChem*. 2009;4(7):1129-1135.
- 87.Yilma A. Singh S. Dixit S. Dennis V. Anti-inflammatory effects of silver-polyvinyl pyrrolidone (Ag-PVP) nanoparticles in mouse macrophages infected with live *Chlamydia trachomatis*. *Int J Nanomedicine* 2013;8(1):2421-2432.
- 88.Singh R. Ramarao P. Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles. *Toxicol Lett* 2012;213(2):249-259.
- 89.Poirier M. Simard J. Antoine F. Girard D. Interaction between silver nanoparticles of 20 nm (AgNP20) and human neutrophils: induction of apoptosis and inhibition of de novo protein synthesis by AgNP20 aggregates. *J Appl Toxicol* 2014;34(4):404-412.
- 90.Bhattacharyya S. Kudgus R. Bhattacharya R. Mukherjee P. Inorganic nanoparticles in cancer therapy. *Pharm Res* 2011;28(2):237-259.
- 91.Sheikpranbabu S. Kalishwaralal K. Venkataraman D. Eom S. Park J. Gurunathan S. Silver nanoparticles inhibit VEGF-and IL-1beta-induced vascular permeability via Src dependent pathway in porcine retinal endothelial cells. *J Nanobiotechnology* 2009;10(1)7-8.

- 92.Gurunathan S. Lee K. Kalishwaralal K. Sheikpranbabu S. Vaidyanathan R. Eom S. Antiangiogenic properties of silver nanoparticles. *Biomaterials* 2009;30(31):6341-6350.
- 93.Wong K. Liu X. Nanomedicine: a primer for surgeons. *J Pediatr Surg* 2012;28(10):943-951.
- 94.Wright J. Lam K. Buret A. Olson M. Burrell R. Early healing events in a porcine model of contaminated wounds: effects of nanocrystalline silver on matrix metalloproteinases, cell apoptosis, and healing. *Wound Repair Regen* 2002;10(3):141-151.
- 95.Kwan K. Liu X, To M. Yeung K. Ho C. Wong K. Modulation of collagen alignment by silver nanoparticles results in better mechanical properties in wound healing. *Nanomedicine* 2011(4):497-504.
- 96.Liu X. Lee P. Ho C. Lui V. Chen Y. Che C. *et al.* Silver nanoparticles mediate differential responses in keratinocytes and fibroblasts during skin wound healing. *ChemMedChem* 2010;5(3):468-675.
- 97.Sintubin L. Verstraete W. Boon N. Biologically produced nanosilver: current state and future perspectives. *Biotechnol Bioeng* 2013(10):2422-24360.
- 98..Astruc D. Transition-metal nanoparticles in catalysis: from historical background to the state-of-the art. *Nanoparticles and Catalysis*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 2008; 1-48.
- 99.Yu L. Shi Y. Zhao Z. Yin H. Wei Y. Liu J. *et al.* Ultrasmall silver nanoparticles supported on silica and their catalytic performances for carbon monoxide oxidation. *Catal Commun* 2011(7):616-620.
- 100.Chimentão R. Kirm I. Medina F. Rodríguez X. Cesteros Y. Salagre P. *et al.* Sensitivity of styrene oxidation reaction to the catalyst structure of silver nanoparticles. *Appl Surf Sci* 2005;252(3):793-800.
- 101.Xu R. Wang D. Zhang J. Li Y. Shape-dependent catalytic activity of silver nanoparticles for the oxidation of styrene. *Chem Asian J* 2006;1(6):888-893.
- 102.den Boer D. Shklyarevskii O. Coenen M. van der Maas M. Peters T. Elemans J. *et al.* Mechano-catalysis: cyclohexane oxidation in a silver nanowire break junction. *J Phys Chem C* 2011;115(16):8295-8299.
- 103.Rashid M. Mandal T. Synthesis and catalytic application of nanostructured silver dendrites. *J Phys Chem C* 2007;111(45):16750-16760.
- 104.Wang G. Zhu X. Jiao H. Dong Y. Li Z. Ultrasensitive and dual functional colorimetric sensors for mercury (II) ions and hydrogen peroxide based on catalytic reduction property of silver nanoparticles. *Biosens Bioelectron* 2012;31(1):337-342.

- 105.Liang Y. Cui Z. Zhu S. Liu Y. Yang X. Silver nanoparticles supported on TiO<sub>2</sub> nanotubes as active catalysts for ethanol oxidation. *J Catal* 2011;278(2):276-287.
- 106.Ahmaruzzaman M. Gayatri S. Activated tea waste as a potential low-cost adsorbent for the removal of p-nitrophenol from wastewater. *J Chem Eng Data* 2010;55(11):4614-4623.
- 107.Swathi T. Buvaneswari G. Application of NiCo<sub>2</sub>O<sub>4</sub> as a catalyst in the conversion of p-nitrophenol to p-aminophenol. *Mater Lett* 2008;62(23):3900-3902.
- 108.Vaidya M. Kulkarni S. Chaudhari R. Synthesis of p-aminophenol by catalytic hydrogenation of p-nitrophenol. *Org Process Res Dev* 2003;7(2):202-208.
- 109.Ai J. Biazar E. Jafarpour M. Montazeri M. Majdi A. Aminifard S. *et al.* Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *Int. J. Nanomedicine* 2011;5(6):1117-1127.
- 110.Andreas E. Howard C. Toxicology of nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;64(2):127-216.
- 111.AshaRani P. Balaji G. Valiyaveetil S. Sethu S. Lim H. Hande M. Differential regulation of intracellular factors mediating cell cycle, DNA repair and inflammation following exposure to silver nanoparticles in human cells. *Genome Integr* 2012;3(2):1-14.
- 112.Arora S. Rajwade J. Paknikar K. Nanotoxicology and *in vitro* studies: the need of the hour. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;258(2):151-165.
- 113.Lewinski N. Colvin V. Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 2008;4(1):26-49.
- 114.Ahamed M. Karns M. Goodson M. Rowe J. Hong Y. Hussain S. *et al.* DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;233(3):404-410.
- 115.Arora S. Jain J. Rajwade J. Paknikar K. Cellular responses induced by silver nanoparticles: *In vitro* studies. *Toxicol Lett* 2008;179(2):93-100.
- 116.Arora S. Jain J. Rajwade J. Paknikar K. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;236(3):310-318.
- 117.AshaRani P. Low M. Hande M. Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS nano* 2009;3(2):279-290.
- 118.Carlson C. Hussein S. Schrand A. Braydich-Stolle L. Jones R. Schlager J. *et al.* Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B* 2008;112(43):13608-13619.

- 119.Park E. Park K. Yi J. Kim Y. Choi K. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicol in Vitro* 2010;24(3):872-878.
- 120.Foldbjerg R. Olesen P. Dang D. Autrup H. Hougaard M. Hoffmann H. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol Lett* 2009;190(2):156-162.
- 121.Rosas-Hernández H. Jiménez-Badillo S. Martínez-Cuevas P. González C. Gracia-Espino E. Terrones H. *et al.* Effects of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings. *Toxicol Lett* 2009;191(2-3):305-313.
- 122.Lubick N. Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles - or both? *Environ Sci Technol* 2008;42(23):8617-8617.
- 123.Greulich C. Muhr G. Köller M. Kittler S. Eppe M. Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs). *Langenbecks Arch Surg* 2009;394(3):495-502.
- 124.Grosse S. Evje L. Syversen T. Silver nanoparticle-induced cytotoxicity in rat brain endothelial cell culture. *Toxicol in Vitro* 2013;27(1):305-313.
- 125.Hsin Y. Chen C. Huang S. Shih T. Lai P. Chueh P. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol Lett* 2008;179(3):130-139.
- 126.Hussain S. Hess K. Gearhart J. Geiss K. Schlager J. *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol in Vitro*. 2005;19(7):975-983.
- 127.Kim T. Kim M. Park H. Shin U. Gong M. Kim H. Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles. *J Biomed Mater Res A* 2012;100(4):1033-1043.
- 128.Kawata K. Osawa M. Okabe S. *In vitro* toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environ Sci Technol* 2009;43(15):6046-6051.
- 129.Gopinath P. Gogoi S. Sanpui P. Paul A. Chattopadhyay A. Ghosh S. Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis. *Colloids Surf, B* 2010;77(2):240-245.
- 130.Hussain S. Javorina A. Schlager J. Schrand A. Duhart H. Ali S. The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion. *Toxicol Sci* 2006;92(2):456-463.
- 131.Samberg M. Monteiro-Riviere N. Oldenburg S. Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin *in vivo* and keratinocytes *in vitro*. *Environ Health Perspect* 2010;118(3):407-413.

132. Chairuangkitti P. Lawanprasert S. Roytrakul S. Aueviriyavit S. Phummiratch D. Kulthong K. *et al.* Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. *Toxicol in Vitro* 2013;27(1):330-338.
133. Franco R. Sánchez-Olea R. Reyes-Reyes E. Panayiotidis M. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: ménage à trois. *Mutat Res* 2009;674(1-2):3-22.
134. Choi S. Lee J. Jeong J. Choy J. Toxicity evaluation of inorganic nanoparticles: considerations and challenges. *Mol Cell Toxicol* 2013;9(3):205-210.
135. Johnston H. Hutchison G. Christensen F. Peters S. Hankin S. Stone V. A review of the *in vivo* and *in vitro* toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit Rev Toxicol* 2010;40(4):328-346.
136. Lankveld D. Oomen A. Krystek P. Neigh A. Troost-de Jong A. Noorlander C. *et al.* The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials* 2010;31(32):8350-8361.
137. Takenaka S. Karg E. Roth C. Schulz H. Ziesenis A. Heyder J. *et al.* Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ Health Perspect* 2001;109(SUPPL. 4):547-551.
138. Yong K. Jin K. Hyun C. Dae R. Jae K. Jung P. *et al.* Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal Toxicol* 2008;20(6):575-583.
139. Sung J. Song M. Lee J. Yu I. Cho M. Ji J. *et al.* Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol Sci* 2009;108(2):452-461.
140. Xue Y. Zhang S. Huang Y. Zhang T. Liu X. Hu Y. *et al.* Acute toxic effects and gender-related biokinetics of silver nanoparticles following an intravenous injection in mice. *J Appl Toxicol* 2012;32(11):890-899.
141. Vlachou E. Chipp E. Shale E. Wilson Y. Papini R. Moiemmen N. The safety of nanocrystalline silver dressings on burns: a study of systemic silver absorption. *Burns* 2007;33(8):979-985.
142. Trop M. Novak M. Rodl S. Hellbom B. Kroell W. Goessler W. Silver-coated dressing Acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. *J Trauma Acute Care Surg* 2006;60(3):648-652.
143. Korani M. Rezayat S. Gilani K. Arbabi S. Adeli S. Acute and subchronic dermal toxicity of nanosilver in guinea pig. *Int J Nanomedicine* 2011;6(5):855-862.
144. Bidgoli S. Mahdavi M. Rezayat S. Korani M. Amani A. Ziarati P. Toxicity assessment of nanosilver wound dressing in Wistar rat. *Acta Medica Iran* 2013;51(4):203-208.



- 145.Wadhera A. Fung M. Systemic argyria associated with ingestion of colloidal silver. *Dermatol Online J* 2005;11(1):12-12.
- 146.Kim Y. Song M. Park J. Song K. Ryu H. Chung Y. *et al.* Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 2010;7(20):1-11.
- 147.Lee J. Yu I. Kim Y. Song K. Ryu H. Sung J. *et al.* Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague-Dawley rats. *Part Fibre Toxicol* 2013;10(36):1-14.
- 148.van der Zande M. Vandebriel R. van Doren E. Kramer E. Herrera Z. Serrano-Rojero C. *et al.* Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano* 2012;6(8):7427-7442.
- 149.Ji J. Jung J. Kim S. Yoon J. Park J. Choi B. *et al.* Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal Toxicol* 2007;19(10):857-871.
- 150.Oberdörster G. Sharp Z. Atudorei V. Elder A. Gelein R. Kreyling W. *et al.* Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 2004;16(6-7):437-445.
- 151.Aliev G. Daza J. Lipsitt A. Martínez-Agüero M. Palacios H. Fischbach K. *et al.* Silver nanoparticles as alternate strategies for drug delivery to the Alzheimer brain. *Alzheimers Dement* 2009;5(4, Supplement):65-65.
- 152.de Jong W. Ven L. Sleijffers A. Park M. Jansen E. van Loveren H. *et al.* Systemic and immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28 days repeated dose toxicity study in rats. *Biomaterials* 2013;34(33):8333-8343.
- 153.Freitas M. Porto G. Lima JL. Fernandes E. Isolation and activation of human neutrophils *in vitro*. The importance of the anticoagulant used during blood collection. *Clin Biochem* 2008;41(7-8):570-575.
- 154.Stone V. Johnston H. Schins R. Development of *in vitro* systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Crit Rev Toxicol* 2009;39(7):613-626.
- 155.Freitas M. Barcellos-de-Souza P. Barja-Fidalgo C. Fernandes E. Nickel induces apoptosis in human neutrophils. *Biometals* 2013;26(1):13-21.
- 156.Jauregui H. Hayner N. Driscoll J. Williams-Holland R. Lipsky M. Galletti P. Trypan blue dye uptake and lactate dehydrogenase in adult rat hepatocytes—Freshly isolated cells, cell suspensions, and primary monolayer cultures. *In Vitro* 1981;17(12):1100-1110.
- 157.Drent M. Cobben N. Henderson R. Wouters E. van Dieijen-Visser M. Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation. *Eur Respir J* 1996;9(8):1736-1742.

- 158.Fotakis G. Timbrell J. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 2006;160(2):171-177.
- 159.Couto D. Freitas M. Dias I. Fernandes E. Vilas-Boas V. Carvalho F. *et al.* Interaction of polyacrylic acid coated and non-coated iron oxide nanoparticles with human neutrophils. *Toxicol Lett* 2014;225(1):57-65.
- 160.Chan L. Kuksin D. Laverty D. Saldi S. Qiu J. Morphological observation and analysis using automated image cytometry for the comparison of trypan blue and fluorescence-based viability detection method. *Cytotechnology* 2014;3(19):1-13.
- 161.Repetto G. del Peso A. Zurita J. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. *Nat Protoc* 2008;3(7):1125-1131.
- 162.Elifio-Esposito S. Tomazeli L. Schwartz C. Gimenez A. Fugii G. Fernandes L. *et al.* Human neutrophil migration and activation by BJcuL, a galactose binding lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom. *BMC Immunology* 2011;12(1):1-7.
- 163.Junqueira L. Carneiro J. *Histologia básica*. 10.<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan; 2004.
- 164.Henderson J. Fulton D. McNeil C. Manning P. The development and *in vitro* characterisation of an intracellular nanosensor responsive to reactive oxygen species. *Biosens Bioelectron* 2009;24(12):3608-3614.
- 165.Ellis J. Mayer S. Jones O. The effect of the NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium on aerobic and anaerobic microbicidal activities of human neutrophils. *Biochem J* 1988;251(3):887-891.
- 166.Costa D. Fernandes E. Santos J. Pinto D. Silva A. Lima JFC. New noncellular fluorescence microplate screening assay for scavenging activity against singlet oxygen. *Anal Bioanal Chem* 2007;387(6):2071-2081.
- 167.Filon F. D'Agostin F. Crosera M. Adami G. Rosani R. Romano C. *et al.* *In vitro* percutaneous absorption of silver nanoparticles. *G Ital Med Lav Ergon* 2007;29(3 Suppl):451-452.
- 168.Larese F. D'Agostin F. Bovenzi M. Crosera M. Adami G. Renzi N. *et al.* Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology* 2009;255(1-2):33-37.
- 169.Bar-Ilan O. Albrecht R. Fako V. Furgeson D. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Small* 2009;5(16):1897-1910.
- 170.Soto K. Garza K. Murr L. Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials. *Acta Biomater* 2007;3(3):351-358.

- 171.Kaur J. Tikoo K. Evaluating cell specific cytotoxicity of differentially charged silver nanoparticles. *Food Chem Toxicol* 2013;51:1-14.
- 172.Cronholm P. Karlsson H. Hedberg J. Lowe T. Winnberg L. Elihn K. *et al.* Intracellular uptake and toxicity of Ag and CuO nanoparticles: a comparison between nanoparticles and their corresponding metal ions. *Small* 2013;9(7):970-982.
- 173.Reddy A. Narsimha Y. Rama D. Himabindu V. *In vitro* cytotoxicity of multi-wall carbon nanotubes on human cell lines. *Toxicol Environ Chem* 2010;92(9):1697-1703.
- 174.Nymark P. Catalan J. Suhonen S. Jarventaus H. Birkedal R. Clausen P. *et al.* Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells. *Toxicology* 2013;313(1):38-48.
- 175.Powers C. Badireddy A. Ryde I. Seidler F. Slotkin T. Silver nanoparticles compromise neurodevelopment in PC12 cells: critical contributions of silver ion, particle size, coating, and composition. *Environ Health Perspect* 2011;119(1):37-44.
- 176.Bookbinder L. Hofer A. Haller M. Keller G. Lim J. Frost G. *et al.* A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics. *J Control Release* 2006;114(2):230-241.
- 177.Kain S. Jen T. Firestone G. Glucocorticoid-regulated trafficking of mouse mammary tumor virus proteins in permeabilized hepatoma cells. Requirements of intracellular membrane transport for maturation of the cytoplasmic phosphorylated polyprotein. *J Biol Chem* 1993;268(26):19640-19649.
- 178.Liu W. Wu Y. Wang C. Li H. Wang T. Liao C. *et al.* Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. *Nanotoxicology* 2010;4(3):319-330.
- 179.Holder A. Marr L. Toxicity of silver nanoparticles at the air-liquid interface. *Biomed Res Int* 2013;2013:1-11.
- 180.Oh S. Kim H. Liu Y. Han H. Kwon K. Chang K. *et al.* Incompatibility of silver nanoparticles with lactate dehydrogenase leakage assay for cellular viability test is attributed to protein binding and reactive oxygen species generation. *Toxicol Lett.* 2014;225(3):422-432.
- 181.Han X. Gelein R. Corson N. Wade-Mercer P. Jiang J. Biswas P. *et al.* Validation of an LDH assay for assessing nanoparticle toxicity. *Toxicology.* 2011;287(1–3):99-104.
- 182.Taleghani F. Yaraii R. Sadeghi R. Haghighi R. Rezvani M. Cytotoxicity of silver nanoparticles on human gingival epithelial cells: an *in vitro* study. *JDS Dental School* 2014;31(4):220-226.
- 183.AshaRani P. Valiyaveetil S. Hande M. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Biol* 2009;10(65):1-14.

184. Kim S. Choi I. Phagocytosis and endocytosis of silver nanoparticles induce interleukin-8 production in human macrophages. *Yonsei Med J* 2012;53(3):654-657.
185. Bartłomiejczyk T. Lankoff A. Kruszewski M. Szumiel I. Silver nanoparticles - allies or adversaries? *Ann Agric Environ Med* 2013;20(1):48-54.
186. Ott M. Gogvadze V. Orrenius S. Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 2007;12(5):913-922.